

**Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Thomas Ruzicka

Analyse der Immunantwort nach onkologischer Immuntherapie

Der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

als kumulative Habilitationsschrift

vorgelegt von

Dr. med. Julia Katharina Tietze

2018

Meinen Eltern und meinem Ehemann

Inhaltsverzeichnis

1. Vorbemerkungen
2. Einleitung
 - 2.1. Hintergrund und Stand der Forschung: Das Immunsystem
 - 2.2. Immunsystem und Melanom
 - 2.3. Immuntherapien
 - 2.3.1. Ipilimumab
 - 2.3.2. Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab
 - 2.3.3. Kombination von Nivolumab und Ipilimumab
 - 2.3.4. Nebenwirkungen
 - 2.4. Relevanz der Habilitationsarbeit
3. Ergebnisse und Diskussion
 - 3.1. Auflistung der zugrundeliegenden eigenen Publikationen A-F
 - 3.2. Beschreibung der Antigen-spezifischen und Antigen-unspezifischen Immunantwort nach auf Zytokinen basierender Immuntherapie (Publikation A)
 - 3.3. Bystander-Aktivierung und der Anti-Tumor-Effekt von CD8⁺ T-Zellen nach Interleukin 2 basierter Immuntherapie ist unabhängig von CD4⁺ T-Zell-Hilfe (Publikation B)
 - 3.4. Lokale Expansion von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen mit einem Antigen-unspezifischen Phänotyp und Antigen-unspezifischer Funktion nach Infektion mit Influenza (Publikation C)
 - 3.5. Korrelation des Anteils der zirkulierenden CD45RO⁺CD8⁺ T-Zellen bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom mit dem Ansprechen der Therapie auf Ipilimumab (Publikation D)
 - 3.6. Niedrige NK-Zell-Anteile im peripheren Blut als prädiktiver Wert für positives Ansprechen auf Ipilimumab in der Therapie des metastasierten Melanoms (Publikation E)
 - 3.7. Stabile Erkrankung oder vollständiges Ansprechen? Evaluation der radiologischen Interpretation des Therapieansprechens auf Immuncheckpoint-Blockade im metastasierten malignen Melanom (Publikation F)
4. Zusammenfassung und Ausblick
5. Verzeichnis der Abkürzungen
6. Literaturverzeichnis
7. Anhang
 - 7.1. Danksagung
 - 7.2. Vollständige Liste aller Publikationen der Habilitandin
 - 7.3. Publikationen A-F

1. Vorbemerkungen

Das Ziel meiner Untersuchungen ist ein besseres Verständnis der Wirkmechanismen der Immuntherapie von Patienten mit metastasiertem Melanom sowie die Identifizierung von prognostischen und von für das Ansprechen auf die Immuntherapie prädiktiven Biomarkern. Die vorliegende Habilitationsschrift basiert auf experimentellen Daten sowie Beobachtungen zur Analyse der Immunantwort nach Immuntherapien bei Mäusen und Menschen. Die Daten für die Arbeit habe ich während meines Forschungsaufenthalts an der University of California, Davis, USA sowie als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München gewonnen.

Es ist zu erwarten, dass die Kenntnis und das tiefere Verständnis der für die Wirkung der Immuntherapie relevanten Zellen sowie die Identifikation von Biomarkern langfristig zu einer wesentlichen Verbesserung der onkologischen Immuntherapie und zu einer auf den individuellen Patienten adaptierten optimalen Behandlung führen werden.

Ziel meiner gegenwärtigen und zukünftigen Forschungstätigkeit ist die Etablierung der gefundenen Marker im klinischen Alltag sowie die Entwicklung weiterer Projekte, um das Verständnis über die Wirkung und Wirkungsverluste der Immuntherapie zu vertiefen.

Die vorgelegte kumulative Habilitationsschrift enthält eine Einführung über die immunologischen sowie klinischen Hintergründe der Arbeit. Danach werden die in meinen Forschungsarbeiten gewonnenen Erkenntnisse im Zusammenhang vorgestellt. Abschließend werden zukünftige Zielsetzungen in diesem Forschungsgebiet dargelegt.

2. Einleitung

2.1. Hintergrund und Stand der Forschung: Das Immunsystem

Das Immunsystem der Wirbeltiere reagiert auf die externe Bedrohung durch Keime oder Gifte sowie auf die interne Bedrohung durch maligne Tumore mit zwei grundsätzlich verschiedenen zellulären Antworten, der ontogenetisch älteren angeborenen Antigen-unspezifischen Immunantwort sowie der ontogenetisch jüngeren erworbenen Antigen-spezifischen Immunantwort. Die Antigen-unspezifischen Fresszellen erkennen Fremdanigene durch Rezeptoren für Krankheitserreger typische repetitive Strukturen auf Fremdorganismen. Zu diesen Fresszellen gehören die Granulozyten und die Makrophagen. Sie nehmen die Fremdorganismen auf und zerstören sie in den meisten Fällen effizient. Eine andere Zellgruppe, die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) erkennen infizierte oder maligne körpereigene Zellen auf einen anderen Weg. Jede körpereigene Zelle trägt auf ihrer Oberfläche Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC-Komplexe), in denen die in der Zelle produzierten Proteine präsentiert werden. Mit Viren infizierte Zellen oder Tumorzellen regulieren die MHC-Komplexe herunter. NK-Zellen können das Fehlen von MHC-Komplexen auf Zellen erkennen und zerstören diese Zellen (Desbois *et al.*, 2012).

Die Antigen-spezifischen Immunzellen identifizieren unterschiedliche Fremdanigene sehr spezifisch über ihre Rezeptoren. Zu diesen Zellen gehören die B-Zellen und T-Zellen. Die Bildung der Antigen-spezifischen Immunzellen ist allerdings sehr komplex, da für jedes potenziell vorkommende Antigen im Voraus zunächst der passende Rezeptor gebildet werden muss, was eine kreative Meisterleistung der Natur ist. Bevor diese Zellen aber im Immunsystem wirksam werden, wird vom Organismus kontrolliert, ob die Antigen-spezifischen Rezeptoren überhaupt Fremdanigene erkennen können. Es ist schließlich auch möglich, dass sie versehentlich an körpereigene Proteine binden und so Autoimmunerkrankungen auslösen würden. Dies könnte großen Schaden verursachen, demzufolge werden diese Zellen eliminiert. Als weitere Sicherheitsmaßnahme benötigen naive, also gerade erst gebildete Antigen-unerfahrene T-Zellen ein zweites Signal von Antigen-präsentierenden Zellen bevor sie tätig werden und durch die Bindung ihres spezifischen Antigens an den T-Zell-Rezeptor (TZR) aktiviert werden können. Auch die naiven B-Zellen benötigen Hilfe bevor sie aktiv werden können. In diesem Fall erhalten sie das Signal von schon aktivierten T-Helferzellen. Die Antigen-unspezifische Immunantwort hat den Vorteil, dass die Antwort sehr rasch einsetzt und die Fresszellen relativ einfach gebildet werden können. Dennoch bietet die Antigen-spezifische Immunantwort große Vorteile gegenüber der unspezifischen Immunantwort. Nach erfolgreicher Aktivierung der Antigen-spezifischen B- oder T-Zellen erfolgt eine klonale Expansion, die zu einer exponentiellen Zunahme der relevanten Zellen in kürzester Zeit führt und damit äußerst effizient die potenzielle Gefahr bekämpfen kann. Weiterhin bilden die Antigen-spezifischen Zellen das immunologische Gedächtnis.

Damit ist der Organismus in der Lage, sofort schon einmal kennengelernte Fremdan Antigene wiederzuerkennen und dermaßen wirksam zu zerstören, dass erst gar keine Krankheit entsteht.

Die Antigen-spezifischen Zellen sind insbesondere wirksam bei akuten Infektionen, eine dauerhafte Stimulation des T- bzw. B-Zell-Rezeptors kann allerdings zu Problemen führen. Eine akute Infektion ist typischerweise in wenigen Tagen erfolgreich bekämpft und damit das Fremdan Antigen verschwunden. Eine chronische Infektion kann dagegen monatelang oder sogar lebenslang bestehen bleiben. Die permanente Verfügbarkeit der Fremdproteine „verwirrt“ die Antigen-spezifischen Zellen, da eine dauerhafte Stimulation bedeuten könnte, dass sie trotz aller vorherigen Kontrollen körpereigene Proteine binden und autoimmune Zellen sind. Da Autoimmunität möglicherweise lebensbedrohlich sein kann, nutzen diese Zellen nun verschiedene Mechanismen, um sich abzuschalten. So exprimieren sie „programmed cell death protein 1“ (PD-1), da die Bindung der T-Zellen an den PD-1-Liganden die T-Zellen in Anergie bringt, also inaktiviert. Der Ligand für PD-1 ist auf vielen Zellen im Körper exprimiert. Dies kann insbesondere bei bestehender Tumorerkrankung, die ja ebenfalls ein chronischer Zustand ist, fatal sein. Es gibt zudem Tumore, die dieses Abschalten des Immunsystems gezielt für ihr Überleben nutzen. Zu diesen Tumoren gehört das maligne Melanom.

Das maligne Melanom ist einer der aggressivsten Tumore des Menschen. Im metastasierten Stadium lag die 3-Jahres-Überlebensrate bis zur Einführung von Ipilimumab im März 2011 bei 15% (Tietze and Berking, 2014). Mit der Zulassung des Checkpoint-Inhibitors Ipilimumab begann eine neue therapeutische Ära, die mit der Entwicklung von BRAF- und MEK-Inhibitoren (Larkin *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2015a) sowie weiteren Immuncheckpoint-Blockaden (ICB) wie den PD-1-Inhibitoren (Larkin *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2015b; Robert *et al.*, 2015c; Robert *et al.*, 2011) immer neue Höhen erlangte.

Insbesondere die ICB setzt auf ein völlig neues Therapieprinzip: Das Melanom verfügt über eine Reihe von Immunabwehrmechanismen, die dazu dienen, der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen bzw. die Immunantwort gezielt zu unterdrücken (Tietze *et al.*, 2011). Die ICB wirkt diesen Mechanismen entgegen. Der „cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4“ (CTLA-4)-Antikörper Ipilimumab war die erste zugelassene Substanz dieser Klasse. Seit Juni und Juli 2015 sind zwei weitere Präparate, nämlich die anti-PD-1-Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab, verfügbar. Die Zulassung der Kombinationstherapie von Nivolumab und Ipilimumab erfolgte im Mai 2016. Die ICB wird inzwischen auch zur Therapie diverser anderer Tumorentitäten verwendet.

2.2. Immunsystem und Melanom

Körpereigene Zellen können jederzeit über erworbene Mutationen zu Tumorzellen werden. Das Entstehen von Mutationen kann durch eine Reihe von äußeren Faktoren wie Virusinfektionen,

energiereiche Strahlung, chronische Entzündungen sowie toxische Substanzen begünstigt werden. Die sich schnell teilenden unsterblichen Tumorzellen werden normalerweise vom Immunsystem erkannt und zerstört. Wenn dies nicht vollständig gelingt, können sogenannte kontrollierte Tumoren entstehen. In diesem Zustand hält sich die Rate der neugebildeten Tumorzellen mit der Rate der zerstörten Tumorzellen im Gleichgewicht. Bei der manifesten Tumorerkrankung hingegen entkommt der Tumor der Immunabwehr und kann ungehindert wachsen (Abb.2.1.) (Dunn *et al.*, 2004).

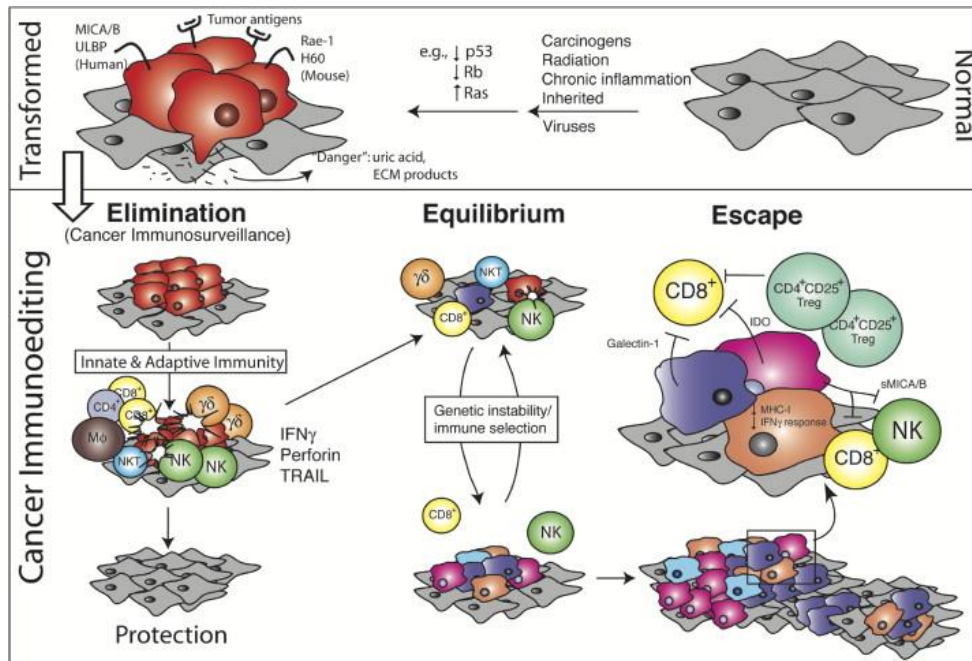


Abb. 2.1: Entstehung von Tumoren (Dunn *et al.*, 2004)

Die Bildung von manifesten Tumoren kann dadurch bedingt sein, dass die Tumorzellen dem körpereigenen Gewebe so ähnlich sind, dass sie nicht als fremd erkannt werden. Oder der Tumor exprimiert so wenige Antigene auf seiner Oberfläche, dass er vom Immunsystem übersehen wird. Das metastasierte Melanom ist dagegen ein besonderer Fall, da hier das Immunsystem durchaus die pathologischen Zellen erkennen kann. So konnten viele verschiedene für Melanomantigene wie „melanoma-associated antigen recognized by T cells“ (MART-1), Tyrosinase, „melanoma-associated antigen“ (MAGE), Glycoprotein 100 (GP 100 „New York esophageal squamous cell carcinoma-1“ (NY-ESO-1) spezifische T-Zellen in Patienten mit metastasiertem Melanom nachgewiesen werden; da aber der Tumor dennoch metastasiert war, scheinen diese T-Zellen nicht oder nicht ausreichend wirksam zu sein (Brichard *et al.*, 1993; Cox *et al.*, 1994; Kawakami *et al.*, 1994; Kirkin *et al.*, 1998; Tietze *et al.*, 2011; van der Bruggen *et al.*, 1991)

Weiterführende Untersuchungen haben ergeben, dass das maligne Melanom die Immunzellen sehr effizient in ihrer Funktion behindern kann. So reguliert es MHC-1-Moleküle herab, um weniger

Antigene auf der Oberfläche zu exprimieren und damit schwerer erkennbar zu werden. Das maligne Melanom schafft sich zudem durch Anreicherung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren ein wachstumsförderndes Mikromilieu und schützt sich vor Apoptose durch die Hochregulation von anti-apoptotischen Molekülen. Zusätzlich exprimiert es für T-Zellen tödliche Moleküle auf der Oberfläche, wie DR4/5, die diese in die Apoptose treiben (Tietze *et al.*, 2011). Auch sezernieren Melanomzellen lösliche „natural killer group 2D“ (NKG2D)-Liganden, die dazu führen, dass natürliche Killerzellen (NK) aber auch T-Zellen nicht mehr mit NKG2D-Rezeptoren an Melanomzellen binden und so den Tumor nicht mehr attackieren können. Weiterhin hemmen Melanomzellen T-Zellen direkt durch Expression vom PD-1-Liganden, oder sie regulieren T-Zellen indirekt durch das Anlocken von regulatorischen T-Zellen und myeloiden Suppressorzellen (MDSC) (Abb. 2.2.) (Tietze *et al.*, 2011).

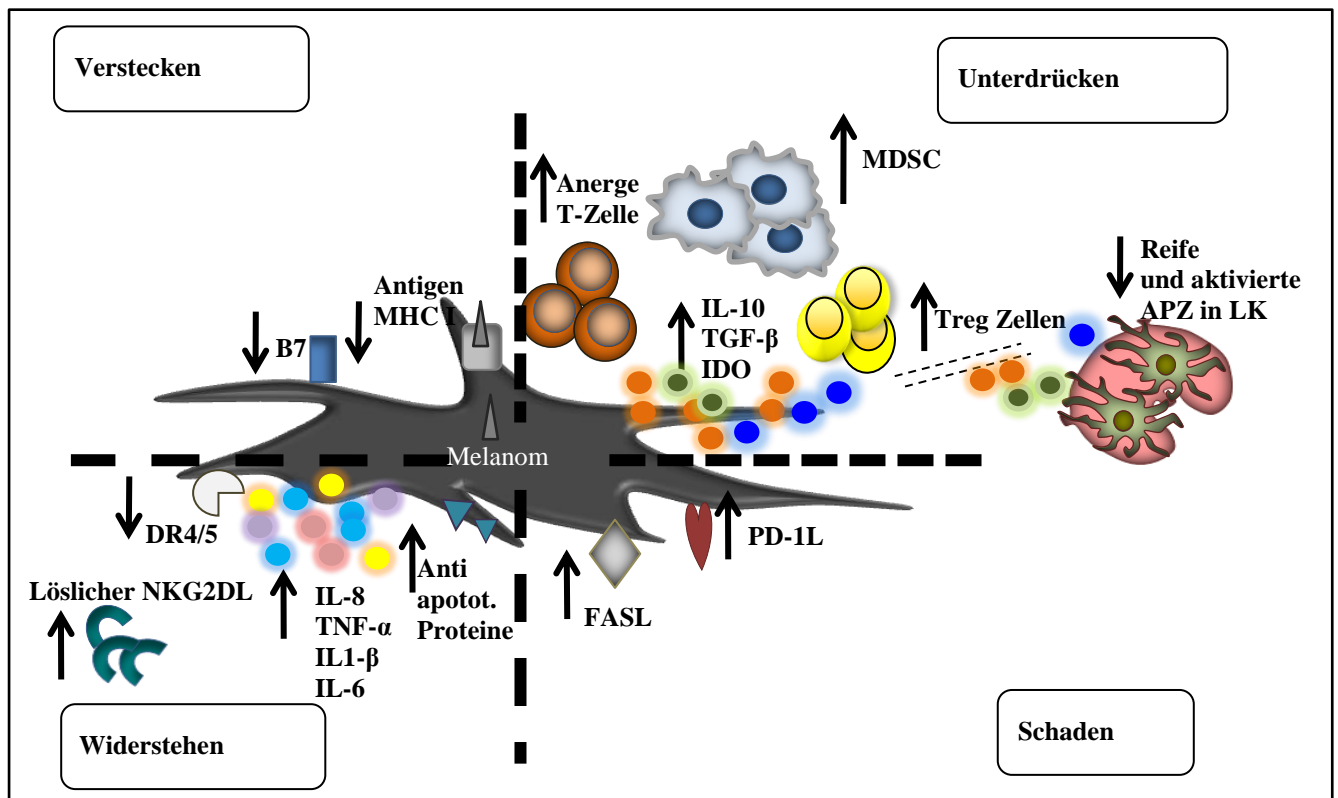


Abb. 2.2.: Abwehrmechanismen des malignen Melanoms

2.3. Immuntherapien

Die onkologische Immuntherapie von metastasierten Melanomen wirkt den immunsuppressiven Mechanismen der malignen Zellen entgegen, indem sie die körpereigene Immunantwort gegen Tumorgewebe verstärkt und dadurch befähigt, den Tumor besser zu attackieren. Es handelt sich also um eine indirekte Therapie. Es gibt verschiedene Ansätze, das Immunsystem zu stärken; so führt die

hochdosierte systemische Gabe des T-Zell Wachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2), eines der am längsten verwendeten Immuntherapeutika, zu einer vermehrten Proliferation von T-Zellen. Hierdurch konnten bei Patienten mit metastasiertem Melanom bei allerdings hoher Toxizität Remissionen erzielt werden (Atkins *et al.*, 1999). Ein anderer Ansatz ist der adoptive Transfer von T-Zellen. Es werden Tumor-infiltrierende T-Zellen oder mit einem für ein oder mehrere Tumorantigene spezifische T-Zell-Rezeptoren versehene transgene T-Zellen gewonnen oder hergestellt, extrakorporal vermehrt und dann dem zuvor immunablativ behandelten Patienten reinfundiert (Besser, 2013). Weitere immuntherapeutische Ansätze sind Tumorstimulationen, die bislang aber nicht den erhofften klinischen Erfolg erbringen konnten (Tietze *et al.*, 2011). Die immunonkologischen Ansätze erzielten erst mit Einführung der Immuncheckpoint-Inhibitoren Ipilimumab, Nivolumab und Pembrolizumab einen Durchbruch in der Melanomtherapie.

2.3.1. Ipilimumab

Ipilimumab ist ein vollständig humanisierter Antikörper gegen CTLA-4. CTLA-4 ist ein inhibitorisches Molekül von T-Zellen, das nach erfolgreicher Aktivierung der T-Zelle auf der Oberfläche hochreguliert wird. Eine Antigen-naïve T-Zelle benötigt mindestens zwei zeitgleich auf sie einwirkende Signale, um aktiviert und damit zu einer Effektor-T-Zelle zu werden. Diese Aktivierung erfolgt in der Regel durch gleichzeitige Bindung des T-Zell-Rezeptors und von CD28, einem stimulierenden Molekül auf T-Zellen. Der Ligand von CD28, B7-1 oder B7-2 wird von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), z. B. von dendritischen Zellen, gleichzeitig mit dem für den Rezeptor der T-Zelle spezifischen Antigen präsentiert. CTLA-4 kann diese Aktivierung inhibieren, indem es mit einer deutlich höheren Affinität an B7-1 bzw. B7-2 bindet und so die Interaktion mit CD28 hemmt. Weiter kann die direkte Bindung des CTLA-4 eine inhibitorische Signalkette innerhalb der T-Zelle auslösen und so auch die Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 reduzieren (Comin-Anduix *et al.*, 2010) (Abb. 2.3.).

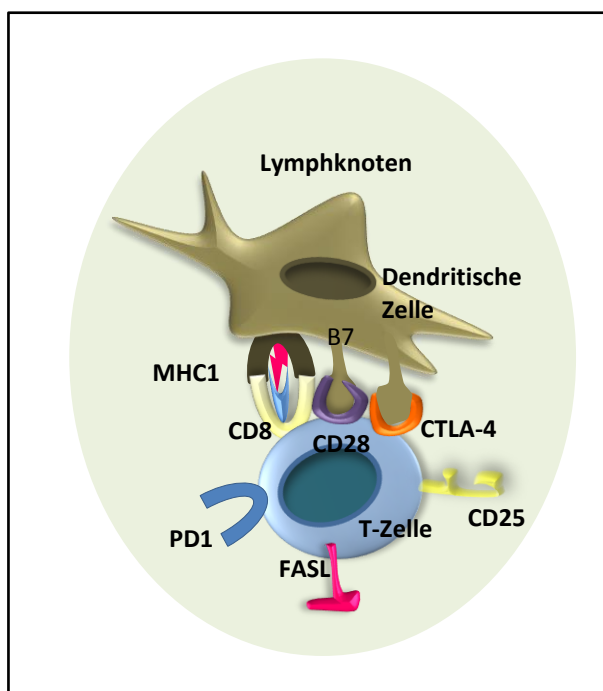


Abb. 2.3.: Aktivierung einer naiven T-Zelle im Lymphknoten

Eine Hemmung von CTLA-4 durch Ipilimumab bewirkt die Aktivierung und Proliferation von naiven und durch die vermehrte Produktion von IL-2 auch von Effektor und Gedächtnis T-Zellen. Durch die vermehrte Proliferation von CD8+ und CD4+ T-Zellen stehen mehr T-Zellen zur Verfügung, die das Melanom infiltrieren und wirkungsvoll bekämpfen können (Abb. 2.4.).

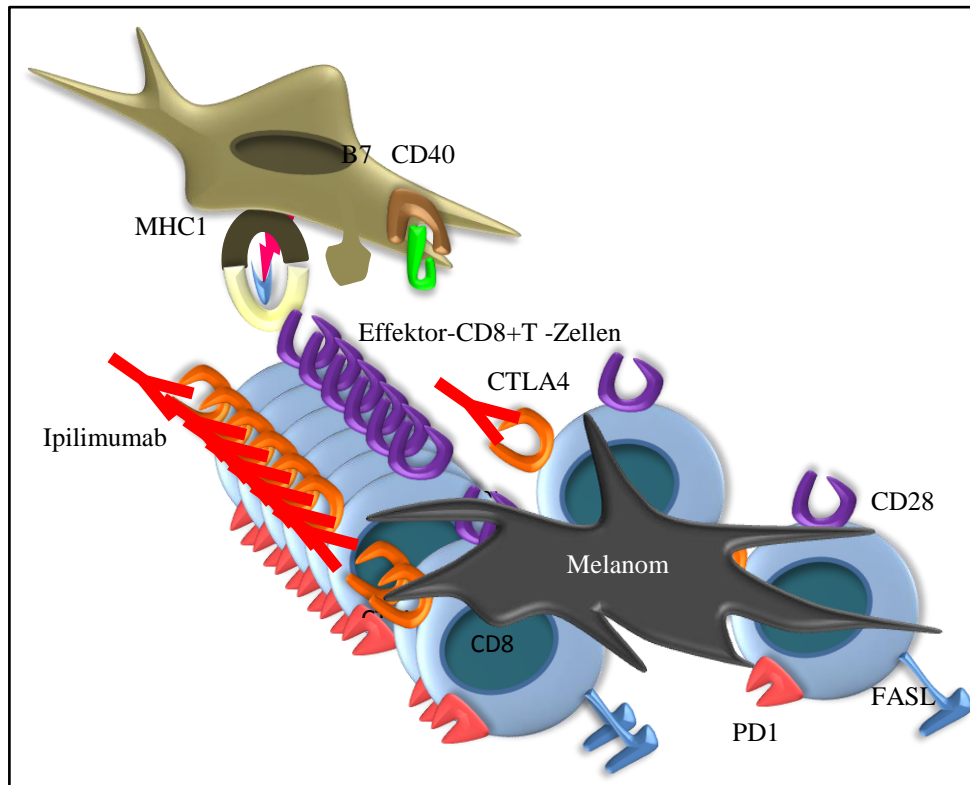


Abb. 2.4.: Die Hemmung von CTLA-4 führt zu einer gesteigerten Proliferation der T-Effektor-Zellen und damit zu einer vermehrten Infiltration dieser Zellen in das Melanom.

CTLA-4 wird zudem auch auf allen regulatorischen T-Zellen (Treg) exprimiert. Diese können die Proliferation anderer T-Zellen unterdrücken, indem sie selbst direkt an die aktivierenden Rezeptoren B7-1 oder B7-2 binden bzw. auf dendritischen Zellen die Expression dieser Moleküle vermindern (Hodi *et al.*, 2010) (Abb. 2.5.).

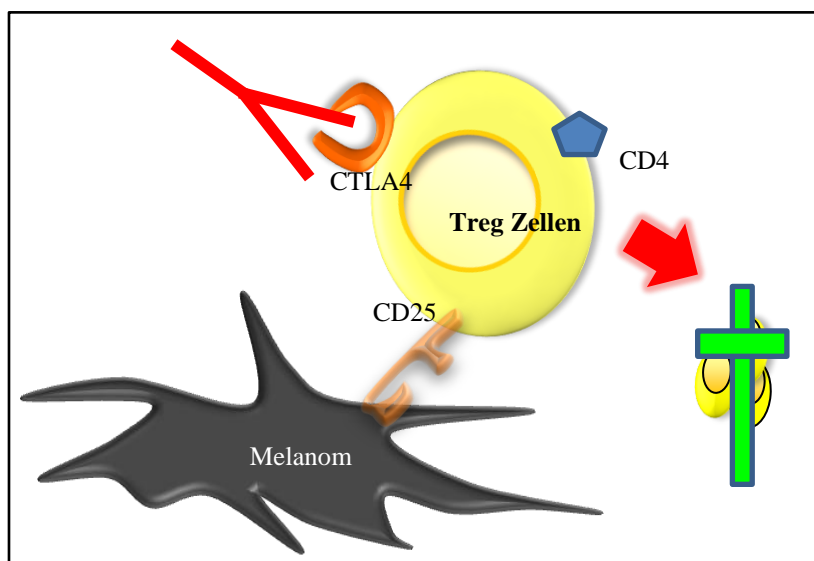


Abb. 2.5.: Die Hemmung von CTLA-4 auf Tregs im Melanom führt zu einer gesteigerten Apoptose.

Ipilimumab ist zur Monotherapie des metastasierten Melanoms zugelassen. Es zeigte sich der Therapie mit DTIC überlegen (Hodi *et al.*, 2010). Die Therapiedauer von Ipilimumab beträgt 3 Monate mit 4 Therapiezyklen alle 3 Wochen in einer Dosierung von 3 mg/kg KG intravenös. Eine 2015 veröffentlichte Studie mit von verschiedenen Studien gepoolten Daten zeigte eine 3-Jahres-Überlebensrate von mit Ipilimumab therapierten metastasierten Melanompatienten von 22%. Von den nicht vorthapierten Patienten überlebten sogar 26% den Zeitraum von 3 Jahren (Schadendorf *et al.*, 2015).

2.3.2. Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab

PD-1 wird auf aktivierten T-Zellen, regulatorischen T-Zellen (Treg), B-Zellen, und auf NK-Zellen exprimiert (Merelli *et al.*, 2014). Weiterhin ist PD-1 ein Marker für sogenannte erschöpfte T-Zellen. Erschöpfung ist ein Zustand, in den reaktive T-Zellen kommen können, die permanent mit Antigen stimuliert werden. Erschöpfte T-Zellen zeichnen sich durch die Expression von inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1 aus. Aber auch „T-cell-immunoglobulin and mucin-domain containing molecule“ 3 (TIM-3) und CTLA-4 können exprimiert werden (Balkhi *et al.*, 2015). Bei Tumorspezifischen T-Zellen kann die permanente Exposition mit Tumorantigenen zur Erschöpfung führen. PD-1 bindet an 2 Liganden, PD-1-L1 und PD-1-L2. PD-L1 befindet sich auf der Oberfläche von dendritischen Zellen, Makrophagen, aktivierten T- und B-Zellen sowie einer Reihe von nicht hämatopoetischen Zellen inklusive Krebszellen. PD-L2 kommt vorrangig auf aktivierten dendritischen Zellen vor. Die Bindung von PD-1 an einen der Liganden kann zu einer Reduktion der Effektorfunktion oder sogar zur Apoptose der T-Zellen führen (Dong *et al.*, 2002). Die Blockade dieser PD-1/PD-L1-Bindung kann die Funktionalität der T-Zellen wiederherstellen (Abb. 2.6.).

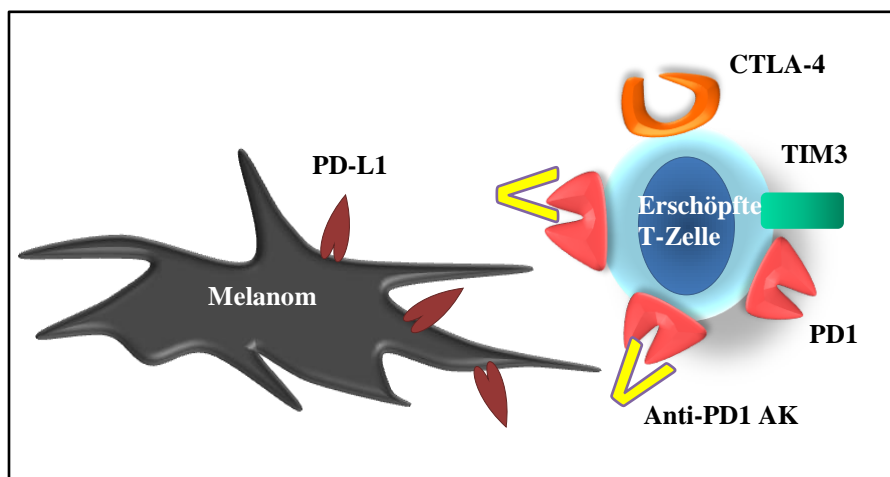


Abb. 2.6.: Die Bindung von Anti-PD1-Antikörper (AK) an auf erschöpften T-Zellen exprimiertem PD-1 kann die Bindung an den PD-1-Liganden verhindern und so die Funktionalität wiederherstellen.

Seit dem Sommer 2015 sind zur Erstlinientherapie des metastasierten malignen Melanoms zwei verschiedene PD-1-Inhibitoren zugelassen.

Nivolumab ist ein humaner monoklonaler gegen PD-1 gerichteter IgG4-Antikörper. In einer randomisierten Phase-III-Studie wurde Nivolumab mit Dacarbazin in der Erstlinientherapie verglichen. 210 Patienten erhielten alle 2 Wochen 3 mg/kg KG Nivolumab und 208 Patienten erhielten Dacarbazin. Die objektive Ansprechrates war 40% unter Nivolumab und 13,9% unter Dacarbazin (Robert *et al.*, 2015b).

Pembrolizumab ist ein humanisierter, monoklonaler IgG4-Antikörper, der ebenfalls an den PD-1-Rezeptor bindet. Seit Juli 2015 ist er in einer Dosierung von 2 mg/KG alle 3 Wochen intravenös zur Therapie des metastasierten malignen Melanoms zugelassen. In einer randomisierten Phase-III-Studie wurde 10 mg/kg KG Pembrolizumab entweder in 2- oder in 3-wöchiger Anwendung mit Ipilimumab verglichen. Das progressionsfreie Überleben nach 6 Monaten betrug 47,3% für Pembrolizumab in der 14-tägigen Anwendung, 46,4% für Pembrolizumab in der 3-wöchigen Anwendung und 26,5% für Ipilimumab. Die Ansprechrates betrugen 33,7% bzw. 32,9% unter Pembrolizumab und 11,9% unter Ipilimumab. (Robert *et al.*, 2015c).

2.3.3. Kombination von Nivolumab und Ipilimumab

Die Kombination der Hemmung von PD-1 und CTLA-4 erschien theoretisch sinnvoll und erwies sich klinisch als äußerst wirksam. Beide Rezeptoren werden auf erschöpften T-Zellen exprimiert und durch ihre gleichzeitige Hemmung konnte eine noch bessere Therapiewirkung als durch die Einzelhemmung erreicht werden. Allerdings geht diese Kombinationstherapie mit deutlich häufiger auftretenden und schwereren, potenziell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen einher als mit der jeweiligen Monotherapie, was in klinischen Phase-III-Studien gezeigt wurde (Larkin *et al.*, 2015; Postow *et al.*, 2015).

In einer Phase-I-Dosis-Eskalationsstudie erhielten 142 Patienten mit metastasiertem Melanom und BRAF-Wildtyp Ipilimumab in einem Verhältnis von 2:1 entweder in Kombination mit Nivolumab oder mit einem Placebo. In 61% (44 von 72) der mit der Kombinationstherapie behandelten Patienten konnte ein objektives Ansprechen beobachtet werden. 22% der Patienten in der Kombinationsgruppe zeigten sogar ein vollständiges Ansprechen. Ähnliche Ansprechrates konnten bei 33 Patienten mit BRAF-Mutation beobachtet werden. Die Kombinationstherapie scheint daher für alle Patienten unabhängig vom BRAF-Mutationsstatus geeignet zu sein (Postow *et al.*, 2015). In einer Phase-III-Studie erhielten 945 Patienten entweder Ipilimumab, Nivolumab oder eine Kombination beider Substanzen. Das progressionsfreie Überleben in der Kombinationsgruppe betrug 11,5 Monate im Vergleich zu 6,9 Monaten mit Nivolumab und 2,9 Monaten mit Ipilimumab als Monotherapie. Interessanterweise wurde beobachtet, dass bei Patienten, deren Melanom PD-L1 exprimierte, das progressionsfreie Überleben unter Nivolumab-Monotherapie genauso hoch war wie unter der

Kombinationstherapie (Larkin *et al.*, 2015). In der Kombination werden Ipilimumab in einer Dosierung von 3 mg/kg KG und Nivolumab in einer Dosierung von 1 mg/kg KG alle 3 Wochen für insgesamt 4 Zyklen gegeben, nachfolgend erhalten die Patienten alle 14 Tage Nivolumab in einer Dosierung von 3 mg/kg KG.

2.3.4. Nebenwirkungen

Die Blockade der Checkpoints PD-1 und CTLA-4 birgt generelle Gefahren. Jede im Körper aktivierte T-Zelle exprimiert zeitgleich mit ihrer Aktivierung eine breite Palette von inhibitorischen Rezeptoren und schützt den Organismus damit vor einer Überaktivierung des Immunsystems, die gefährliche z. T. sogar tödliche Folgen haben kann. Durch Blockade dieser Hemmung können demzufolge Überaktivierungen des Immunsystems entstehen, die zu potenziell tödlichen Autoimmunerkrankungen führen können. Prinzipiell kann jedes Organsystem von autoimmunen Reaktionen betroffen sein, einige Organe scheinen aber anfälliger zu sein, was möglicherweise an der größeren Exposition dieser Organe zur Umwelt und damit einer erhöhten generellen Immunaktivität liegt. Generell sind die Nebenwirkungen von Ipilimumab und den anti-PD-1-Antikörpern ähnlich, allerdings treten unter Ipilimumab häufiger nämlich bei 17% der Patienten schwere und selten sogar tödliche Nebenwirkungen auf. Die autoinflammatorische Colitis ist die häufigste schwere Nebenwirkung. Sie bedarf einer sofortigen Hochdosistherapie mit Kortikosteroiden, da sie sonst oft nur sehr schwierig therapeutisch beeinflusst werden kann. Eine weitere, häufiger auftretende Nebenwirkung (6%) der Ipilimumabtherapie ist die Hypophysitis. Sie ist wahrscheinlich durch eine direkte toxische Wirkung des Antikörpers bedingt, da die Hypophyse selbst CTLA-4 exprimiert. Die Hypophysitis führt meist zu einem dauerhaften partiellen Funktionsverlust, am häufigsten des Vorderlappens und damit zu einer lebenslangen Substitutionspflicht der entsprechenden Hormone.

Die anti-PD-1 Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab sind deutlich besser verträglich. Nur bei etwa 5 bzw. 11,7% oder bei 13,3 bzw. 10,1% der Patienten waren schwere oder sehr schwere Nebenwirkungen festzustellen (Robert *et al.*, 2015b; Robert *et al.*, 2015c; Weber *et al.*, 2015).

Die Toxizität wurde durch die Kombination von Ipilimumab und Nivolumab signifikant verstärkt, da hier bei über 50% der Patienten schwere oder sogar sehr schwere Nebenwirkungen auftreten. Die Nebenwirkungen waren aber in den meisten Fällen gut therapierbar (Larkin *et al.*, 2015; Postow *et al.*, 2015).

Conclusio: Durch die über Antikörper vermittelte ICB ist in der onkologischen Dermatologie ein Durchbruch in der Melanomtherapie gelungen. Es handelt sich bei der ICB mit Antikörpern um einen indirekten Therapieansatz, da nicht direkt der Tumor im Rahmen der Medikation angegriffen wird, sondern der therapeutische Erfolg indirekt über eine (Re)-Aktivierung des körpereigenen Immunsystems erzielt wird; dadurch ist ein langfristiges Therapieansprechen, vielleicht sogar eine Heilung, des metastasierten Melanoms möglich. Immuncheckpoint-Inhibitoren haben insbesondere in

der Kombination einen hohen Wirkungsgrad, allerdings ist der genaue Wirkmechanismus besonders im Hinblick auf die für den Effekt relevanten Zellen immer noch unklar. Weiterhin wirkt die ICB nicht bei allen Patienten und die Ansprecher und Nichtansprecher sind prätherapeutisch bislang nicht identifizierbar. Die autoimmun vermittelten Nebenwirkungen können schwer oder sogar tödlich verlaufen. Ein engmaschiges Monitoring der Patienten sowie die Kenntnis über die korrekte Therapie der möglichen Nebenwirkungen sind daher von großer Bedeutung.

2.4. Relevanz der Rehabilitationsarbeit

ICB wird vermutlich in Zukunft auch bei vielen weiteren Tumorerkrankungen eine tragende Rolle spielen. Ein besseres Verständnis des Wirkmechanismus ist für die optimale Therapieanwendung von hoher Wichtigkeit. Bislang galt in der Immunologie die Regel, dass T- oder B-Zellen nur Antigen-spezifisch agieren. Wir konnten demgegenüber zeigen, dass ein bislang nicht bekannter Zelltyp, nämlich Antigen-unspezifisch aktivierte CD8+ Gedächtnis-T-Zellen, zur Tumorabwehr nach Stimulation des Immunsystems durch Immuntherapie beitragen. Da diese Zellen in großer Zahl vorliegen und als Antigen-erfahrene Gedächtnis-T-Zellen in der Regel keine Autoimmunität verursachen, kann möglicherweise mit noch gezielterer Stimulation dieser Zellen zukünftig ein noch besseres Therapieansprechen bei geringeren Nebenwirkungen erzielt werden. Weiterhin haben wir feststellen können, dass diese Zellen auch unter natürlichen Bedingungen wie Infektionen einen Beitrag zur Infektionsabwehr leisten (Sckisel *et al.*, 2014; Tietze *et al.*, 2012).

Leider wirkt ICB nicht bei jedem Patienten und es gibt nicht selten schwere immunvermittelte Nebenwirkungen. Weiterhin sind die Kosten der Therapie sehr hoch. Demzufolge wären Biomarker zur prätherapeutischen Identifikation von Ansprechern außerordentlich hilfreich. Wir konnten in der vorliegenden Habilitationsschrift einen möglicherweise prädiktiven Marker für das Ansprechen auf Ipilimumab identifizieren. In unserer Kohorte wäre mit Anwendung dieses Biomarkers zur Selektion der Patienten vor Therapie die Ansprechrate auf Ipilimumab von durchschnittlich 25% auf etwa 67% gesteigert worden (Tietze *et al.*, 2017a).

Ein weiterer sehr wichtiger Aspekt bei Behandlung mit ICB ist die radiologische Bewertung des Ansprechens. Die Abnahme der Tumorgröße ist für das Therapieansprechen der bislang wichtigste Parameter gewesen. Wir haben beobachtet, dass bei Patienten nach oder unter Immuntherapie dieses Kriterium zur vollständigen Beurteilung des Therapieansprechens nicht ausreichend ist (Tietze *et al.*, 2017). Bei Patienten mit stabiler Erkrankung (SD) ist es sinnvoll, den Metabolismus des Tumors in die Interpretation mit einzubeziehen. Wir konnten zeigen, dass bei Patienten mit SD, aber ohne metabolische Tumoraktivität, wahrscheinlich keine weitere Fortführung der Immuntherapie mehr notwendig ist. Diese Erkenntnis ist sehr relevant, da mit Therapieende von ICB das Risiko schwerer Nebenwirkungen sinkt, die Lebensqualität steigt und enorme Kosten eingespart werden können (Tietze *et al.*, 2017b).

3. Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel meiner Untersuchungen ist ein besseres Verständnis der Wirkmechanismen der Immuntherapie, die Identifizierung von prognostischen und prädiktiven Biomarkern für die Immuntherapie, sowie die Verbesserung der radiologischen Einschätzung des therapeutischen Ansprechens.

3.1. Auflistung der relevanten eigenen Publikationen A-F

A) **Tietze JK**, Wilkins DE, Sckisel GD, Bouchlaka MN, Alderson KL, Weiss JM, Ames E, Bruhn KW, Craft N, Wiltout RH, Longo DL, Lanier LL, Blazar BR, Redelman D, Murphy WJ

Delineation of antigen-specific and antigen-nonspecific CD8 (+) memory T-cell responses after cytokine-based cancer immunotherapy

Blood 2012, 119:3073-3083, Impact Factor 9,1

B) Monjazebe AM*, **Tietze JK***, Grossenbacher SK, Hsiao HH, Zamora AE, Mirsoian A, Koehn B, Blazar BR, Weiss JM, Wiltout RH, Sckisel GD, Murphy WJ

(*These authors contributed equally to the work)

Bystander activation and anti-tumor effects of CD8+ T cells following interleukin-2 based immunotherapy is independent of CD4+ T cell help

PLoS One. 2014, 9:e102709, Impact Factor 3,2

C) Sckisel GD*, **Tietze JK***, Zamora AE, Hsiao HH, Priest SO, Wilkins DE, Lanier LL, Blazar BR, Baumgarth N, Murphy WJ

(*These authors contributed equally to the work)

Influenza infection results in local expansion of memory CD8 (+) T cells with antigen non-specific phenotype and function

Clin Exp Immunol. 2014, 175:79-91, Impact Factor 3,1

D) **Tietze JK**, Angelova D, Heppt MV, Reinholz M, Murphy WJ, Spannagl M, Ruzicka T, Berking C
The proportion of circulating CD45RO+CD8+ memory T cells is correlated with clinical response in melanoma patients treated with ipilimumab

Eur J Cancer 2017, 75:268-279, Impact Factor 6,1

E) **Tietze JK**, Angelova D, Heppt MV, Ruzicka T, Berking C

Low amounts of NK cells may predict a positive response to ipilimumab in melanoma therapy

Exp Dermatol. 2017, 26:622-629, Impact Factor 2,7

F) **Tietze JK**, Heppt MV, Angelova D, Ruzicka T, Berger F, Berking C

Stable disease or complete response? A critical evaluation of the radiologic response to immune checkpoint blockade in advanced melanoma

Hautarzt 2017, 68: 632-638 Impact Factor 0,5

3.2. Beschreibung der Antigen-spezifischen und Antigen-unspezifischen Immunantwort nach auf Zytokinen basierender Immuntherapie (Publikation A)

Das Immunsystem besteht aus einer Plethora von verschiedenen Immunzellen, die auf sehr komplexe Art und Weise zusammenwirken können. Es sind eine Reihe von verschiedenen Immunzellen als relevant für die Antitumorantwort beschrieben worden. Unser Ziel war es, die Immunzellen zu identifizieren, die für die Immunantwort nach Immuntherapie verantwortlich sind. In Voruntersuchungen wurden mit einem immunonkologischen Mausmodell verschiedene, auf der Gabe von Zytokinen basierende Immuntherapien auf ihre Wirksamkeit hin evaluiert. Dabei wurden Nierenkarzinomzellen subkutan oder intravenös in BALB/c-Mäuse injiziert und die so behandelten Mäuse mit verschiedenen Immuntherapeutika therapiert. Es zeigte sich, dass die Kombination aus anti-CD40-Antikörpern und IL-2 am wirksamsten war (Murphy *et al.*, 2003) (Abb. 3.2.1.).

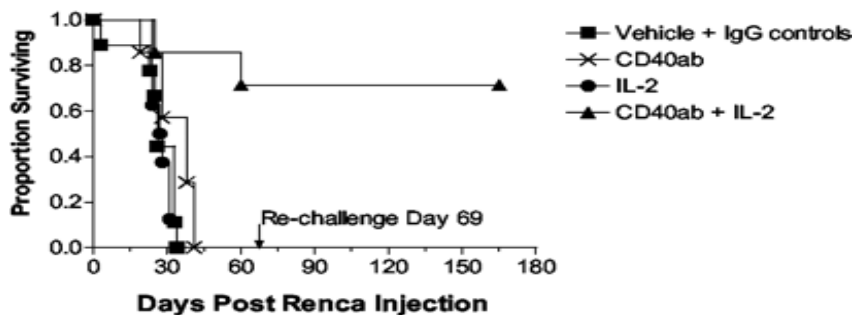


Abb. 3.2.1.: Die Kombination von anti-CD40-AK mit IL-2 war therapeutisch deutlich wirksamer als die jeweiligen Monotherapien (Murphy *et al.*, 2003).

Durch Depletion verschiedener Zellgruppen konnten die CD8⁺ T-Zellen als die für den Effekt der Therapie wichtigsten Zellen identifiziert werden (Murphy *et al.*, 2003). Es sollte dann festgestellt werden, welche Subpopulation von CD8⁺ T-Zellen für die anti-tumorale Wirkung der Immuntherapie verantwortlich war. C57/BL6- und Balb/c-Mäuse wurden dazu intraperitoneal mit einer Immuntherapie aus Anti-CD40-Antikörpern und IL-2 behandelt (Abb. 3.2.2.).

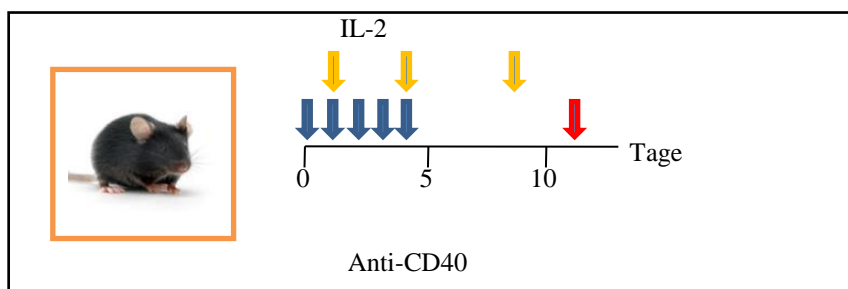


Abb. 3.2.2.: Die Injektionen mit anti-CD40 AK erfolgten an den Tagen 0-4 1 x tgl., die Injektionen mit IL-2 an den Tagen 2, 4 und 8 2x täglich.

Die Immunphänotypisierung der Zellen mittels FACS-Analyse ergab, dass eine bestimmte Zellpopulation, nämlich CD44^{high}CD8⁺ T-Zellen, stark unter der Immuntherapie proliferierte. Die hohe Expression von CD44 ist ein Marker für Gedächtnis-T-Zellen in der Maus (Abb. 3.2.3.).

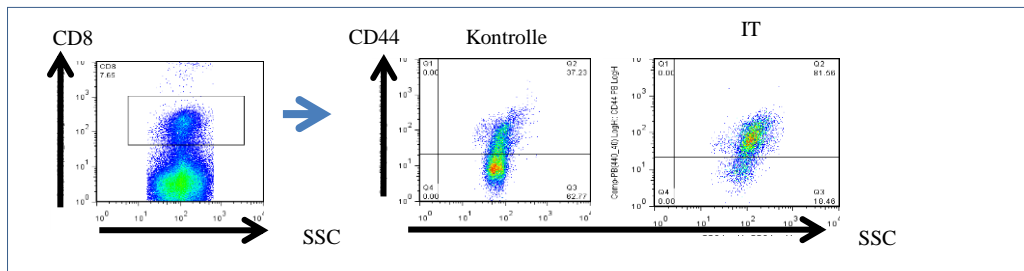


Abb. 3.2.3.: Nach Immuntherapie proliferieren die CD44^{high} CD8⁺ T-Zellen.

Die Analyse weiterer Färbungen ergab ferner, dass diese spezifische Zellpopulation einen aktivierten Phänotyp mit positiver Granzyme B Expression aufwies und in der Lage war, Tumorzellen *in vitro* zu lysieren (Abb.3.2.4.) (Tietze *et al.*, 2012).

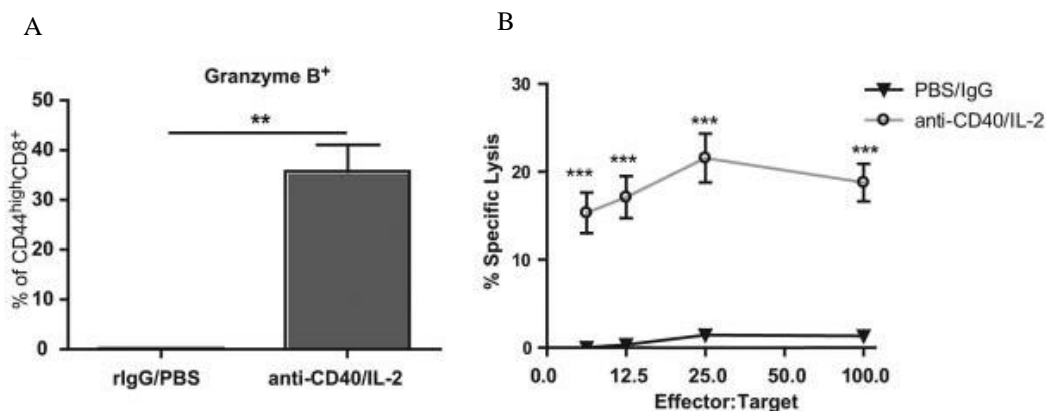


Abb. 3.2.4.: A) Granzyme B Expression von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen nach Immuntherapie in der Maus ist erhöht. B) Der Tumor-Killing-Assay zeigt eine gesteigerte Lyse von Tumorzellen durch die T-Zellen nach Immuntherapie in der Maus.

Als nächsten Schritt überprüften wir die Expression von CD25 auf den CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen. CD25 ist die α -Kette des IL-2-Rezeptors und wird nach Bindung des T-Zell-Rezeptors durch ein spezifisches Antigen hochreguliert. CD25 ist demnach ein Aktivierungsmarker, der zeigt, dass die T-Zelle über ihren Rezeptor gebunden ist. Ein Fehlen von CD25 lässt demzufolge auf eine fehlende oder Antigen-unabhängige Aktivierung dieser Zellen schließen.

Unsere Analysen ergaben, dass die CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen zu einem großen Anteil kein CD25 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Daraufhin untersuchten wir die Expression eines anderen Aktivierungsmarkers, nämlich von NKG2D. NKG2D ist ein aktivierender Rezeptor, der von NK-Zellen, aber auch von $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie von aktivierten CD8⁺ T-Zellen in der Maus exprimiert wird. NKG2D ist in der Immunantwort ein relevantes Molekül; NKG2D-Knockout-Mäuse haben eine geschwächte Tumorabwehr (Champsaur and Lanier, 2010). In unserem Mausmodell wurde nach Immuntherapie NKG2D auf den CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen stark hochreguliert (Abb. 3.2.5.). Die CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen waren zwar mehrheitlich CD25⁻, das heißt der TZR war nicht gebunden,

aber sie waren dennoch aktiviert, da sie NKG2D⁺ waren. Wir hatten folglich Hinweise, dass diese Zellen Antigen-unspezifisch aktiviert worden waren und zu den sogenannten Bystander-Zellen zählten.

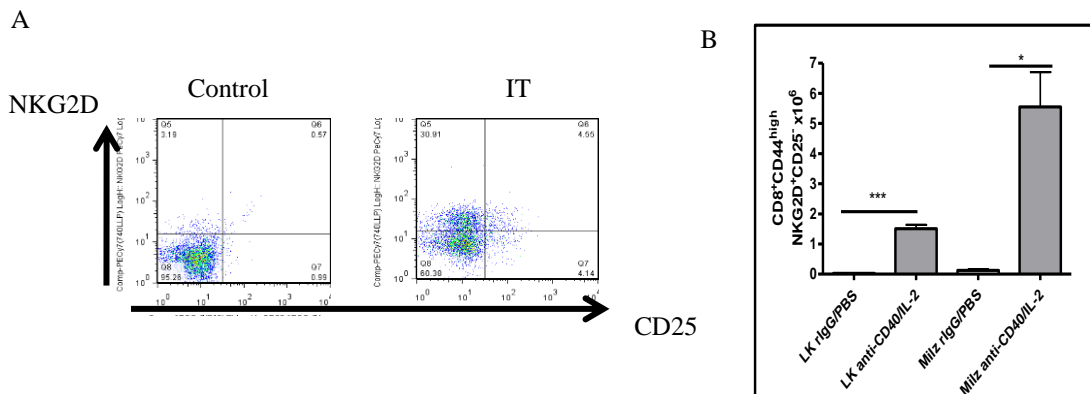


Abb. 3.2.5.: A) Expression von NKG2D sowie fehlende Expression von CD25 auf CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen nach IT ist ein Hinweis für Antigen-unabhängige Aktivierung. B) Die Proliferation dieser Zellen ist im Lymphknoten und in der Milz nachweisbar (Tietze *et al.*, 2012).

Um zu beweisen, dass die CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen tatsächlich Antigen-unspezifisch stimuliert und aktiviert wurden, nutzten wir ein Modell der transgenen Maus, nämlich die OT-1-Maus. Die CD8⁺ T-Zellen in der OT-1-Maus exprimieren ausschließlich den TZR für Ovalbumin. Wir impften die Mäuse mit Ovalbumin, um Gedächtniszellen zu generieren, und behandelten sie 6-8 Wochen später mit Immuntherapie. Auch in diesen transgenen Mäusen zeigten die CD8⁺ T-Zellen nach IL-2-/anti-CD40-Therapie den NKG2D⁺CD25⁺CD44^{high} Phänotyp. Weiterhin wiesen die transgenen CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen eine erhöhte Granzyme B Expression sowie die Kapazität zur Lyse von Tumorzellen in vitro auf (Abb. 3.2.6./7.). Dies deutete auf eine normale Funktionalität hin. Auch in vivo konnte eine signifikante anti-tumorale Wirkung nach Immuntherapie beobachtet und somit die Bedeutung der Antigen-unspezifisch aktivierten CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei der Tumorablewehr bestätigt werden (Abb. 3.2.8.). Diese Antigen-unspezifisch aktivierten CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen wurden nach Immuntherapie in allen untersuchten Organen wie Lunge, Lymphknoten und Milz beobachtet (Tietze *et al.*, 2012).

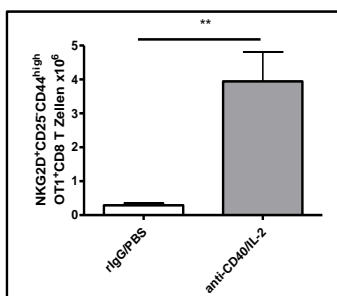


Abb. 3.2.6.: Immuntherapie mit anti-CD40 und IL-2 führt in OT1-Mäusen zur Proliferation von NKG2D⁺CD25⁺CD44^{high} CD8⁺ T-Zellen.

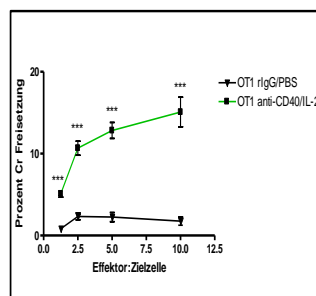


Abb. 3.2.7.: CD8-Zellen nach Immuntherapie mit anti-CD40 und IL-2 sind in der Lage, Tumorzellen zu lysieren.

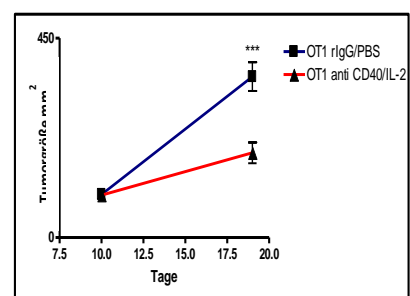


Abb. 3.2.8.: Immuntherapie in OT1-Mäusen verlangsamt signifikant das Tumorwachstum von subkutanen Lewis-Lungen-Tumoren.

T-Zellen wirken, indem sie mit ihrem TZR spezifische Antigene erkennen. Es stellte sich hier die Frage, wie eine Antigen-unspezifisch aktivierte CD8+ Gedächtnis-T-Zelle ihr Zielantigen, in unserem Modell die Tumorzellen, erkennen kann. Die durch die Immuntherapie Antigen-unspezifisch stimulierten CD8+ Gedächtnis-T-Zellen exprimierten in der Mehrzahl NKG2D. Der Ligand für NKG2D wird von proliferierenden und infizierten Körperzellen hochreguliert, wird aber auch auf verschiedenen Tumorzellen gefunden. Demzufolge vermuteten wir, dass die CD8+ Gedächtnis-T-Zellen ihr Zielantigen über den NKG2D-Rezeptor identifizieren. Um diese Hypothese zu beweisen, blockierten wir den Rezeptor mit Antikörpern. In unserem Modell führte die Hemmung des NKG2D-Rezeptors zu einer signifikant verringerten Antitumorwirkung der durch Immuntherapie Antigen-unspezifisch aktivierten CD8+ Gedächtnis-T-Zellen (Abb. 3.2.9).

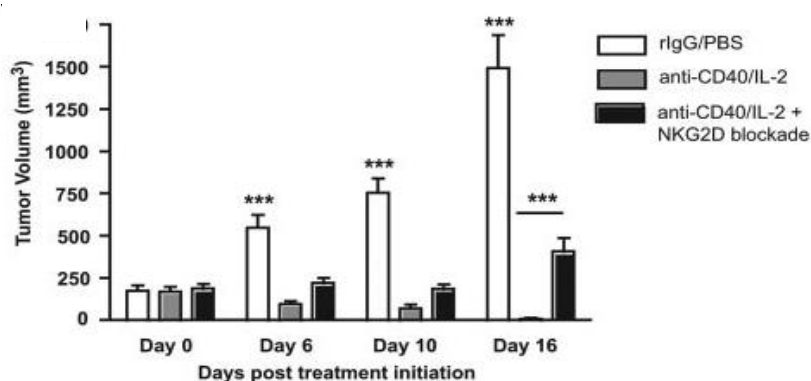


Abb. 3.2.9.:
Die Blockade des NKG2D-Rezeptors führt zu einem vermehrten Tumorwachstum in BALB/c-Mäusen unter Immuntherapie (Tietze *et al.*, 2012).

Nun galt es herauszufinden, ob sich diese CD8+ Gedächtnis-T-Zellen auch nach unspezifischer Immunstimulation im Menschen nachweisen lassen. Hierzu stimulierten wir humane T-Zellen in vitro. Da NKG2D ubiquitär auf CD8+ T-Zellen exprimiert wird, entschieden wir uns, als Marker für Antigen-unspezifische Stimulation die Expression von HLA-DR auf den CD8+ T-Zellen zu nutzen. Es zeigte sich erneut, dass eine über Bindung des TZR eingeleitete Stimulation zur Hochregulation von CD25 und HLA-DR führt, wohingegen bei Antigen-unspezifischer Stimulation mit IL-2 nur HLA-DR hochreguliert wird (Abb.3.2.10).

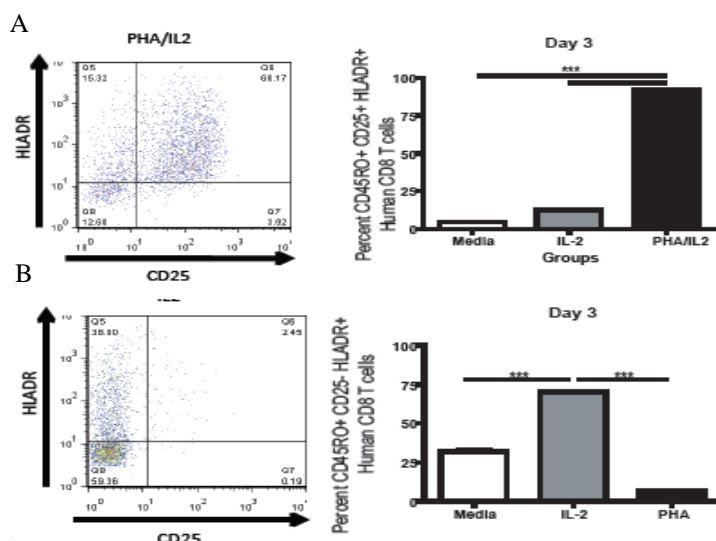


Abb. 3.2.10.
A) Stimulation durch TZR kreuzvernetzendes Lectin führt zu Hochregulation von HLA-DR und CD25 B) Unspezifische Stimulation mit IL-2 führt zu Hochregulation von HLA-DR ohne Hochregulation von CD25 (Tietze *et al.*, 2012).

Um diese Zellen auch nach lokaler Immunstimulation im Menschen nachweisen zu können, wurden Patienten mit malignem Melanom vor Exzision 14 Tage lang mit Imiquimod, einem Toll-like Rezeptor-7-Agonist, therapiert. Es zeigte sich auch unter dieser unspezifischen Therapie eine Anreicherung von Lymphozyten im Tumor. In der immunhistochemischen Färbung waren diese Zellen CD8+ und CD25- (Abb. 3.2.11.).

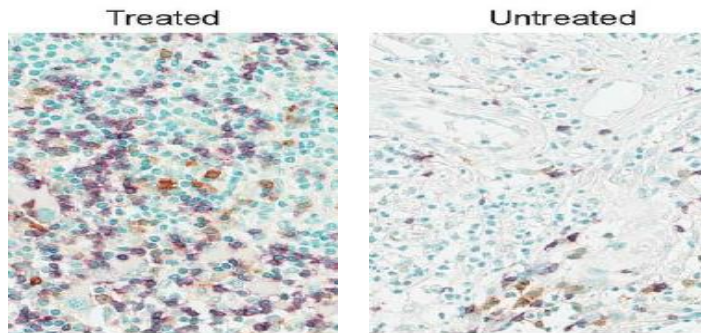


Abb. 3.2.11.: Behandlung mit Imiquimod führt zur Infiltration von CD8+CD25- T-Zellen in das Melanom. In unbehandelten Melanomen fehlt dieses Infiltrat (Tietze *et al.*, 2012).

Schlussfolgerung: Wir konnten zeigen, dass Antigen-unspezifisch aktivierte CD8+ Gedächtnis-T-Zellen nach Immuntherapie zur Tumorabwehr beitragen. Diese Zellen erkennen den Tumor durch den NKG2D-Rezeptor und zerstören die Zellen wirkungsvoll. Auch nach Antigen-unspezifischer lokaler Immunstimulation im Menschen kann man die Migration von Antigen unspezifisch aktivierten CD8+ Gedächtnis-T-Zellen in den Tumor beobachten.

3.3. Bystander-Aktivierung und Anti-Tumor-Effekt von CD8⁺ T-Zellen nach Interleukin 2 basierter Immuntherapie ist unabhängig von CD4⁺ T-Zell-Hilfe (Publikation B)

Es gibt eine Vielzahl von Publikationen, die zeigen, dass die optimale Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen die Hilfe von CD4⁺ T-Zellen benötigt (Kennedy and Celis, 2006; Kumamoto *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009). Der Hauptanteil dieser Daten fokussiert sich auf die CD4⁺ T-Zell-Hilfe für Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zell-Expansion, allerdings war die Rolle von CD4⁺ T-Zellen in der Antigen-unspezifischen Stimulation bislang nicht geklärt. Um zu ermitteln, ob CD4⁺ T-Zellen für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen unter Immuntherapie notwendig sind, nutzten wir mehrere Mausmodelle, in denen die CD4⁺ T-Zellen fehlten. In dem Kurzzeitdepletionsmodell wurden in C57/BL6-Mäusen die CD4⁺ T-Zellen vollständig über intraperitoneale Injektionen von anti-CD4-Antikörpern an den Tagen 0, 4, und 8 entfernt, während die Mäuse gleichzeitig Immuntherapie erhielten. Da beschrieben wurde, dass der Funktionsverlust der CD8⁺ T-Zellen erst nach einem längeren Fehlen der CD4⁺ T-Zellen auftritt, etablierten wir ein Langzeitdepletionsmodell, in dem die Mäuse über 4 Wochen zweimal pro Woche intraperitoneale Injektionen von anti-CD4-Antikörpern erhielten. Es wurden für die Versuche zusätzlich auch CD4-Knockout (KO)-Mäuse verwendet, die von Geburt an keine CD4⁺ T-Zellen bilden können (Abb. 3.3.1.). Die von CD4⁺ T-Zellen befreiten C57/BL6-Mäuse wurden alle mit Immuntherapie behandelt. Wir verglichen nach Immuntherapie die CD8⁺ T-Zellen von C57/BL6-Mäusen, bei denen die CD4⁺ T-Zellen fehlten, mit den CD8⁺ T-Zellen von nicht depletierten Wildtyp (WT)-Mäusen.

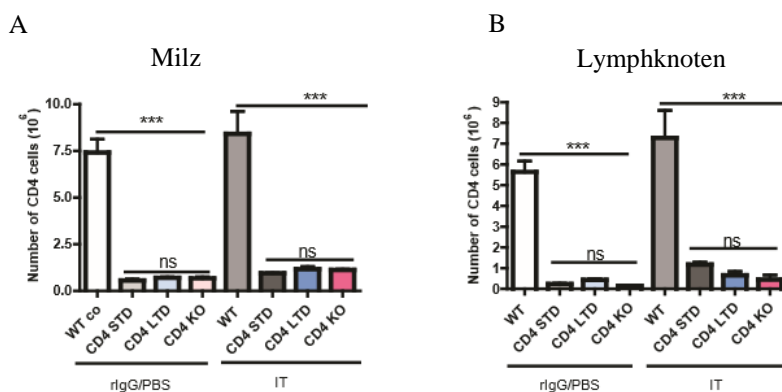


Abb. 3.3.1.: Die Kurzzeitdepletion, die Langzeitdepletion sowie die CD4 KO-Maus führen alle zu einem nahezu vollständigen Fehlen der CD4⁺ T-Zellen in A) Milz und B) Lymphknoten (Monjazebe *et al.*, 2014).

In den Mäusen ohne CD4⁺ T-Zellen war eine mit den WT-Mäusen vergleichbare Proliferation der CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen nach Immuntherapie zu beobachten, was sich auch mit dem Nachweis eines gesteigerten Bromdesoxyuridin (BrdU)-Einbaus zeigen ließ (Abb. 3.3.2.).

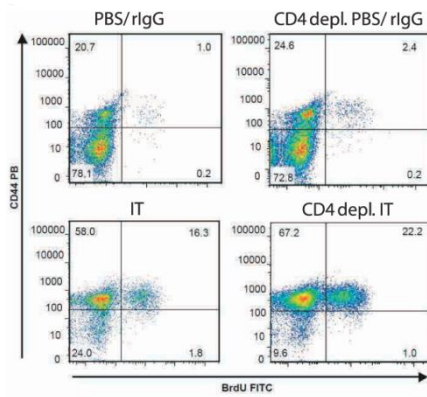


Abb. 3.3.2.: Gesteigerter BrdU Einbau in die CD8+ Gedächtnis-T-Zellen nach Immuntherapie (IT) in Wildtyp oder CD4 depletierten Mäusen (Moniazeb *et al.*

Die CD8+ Gedächtnis-T-Zellen zeigten den gleichen, schon bekannten NKG2D+CD25-CD44^{high} Phänotyp und waren demzufolge wieder die Antigen-unspezifisch aktivierten CD8+ Gedächtnis-T-Zellen, die sogenannten Bystander-Zellen. In allen der untersuchten Modelle zeigte sich eine ungehinderte Proliferation der NKG2D+CD25-CD8+ Gedächtnis-T-Zellen nach Immuntherapie, die in einigen Fällen sogar signifikant ausgeprägter war als in den WT-Mäusen (Abb. 3.3.3.).

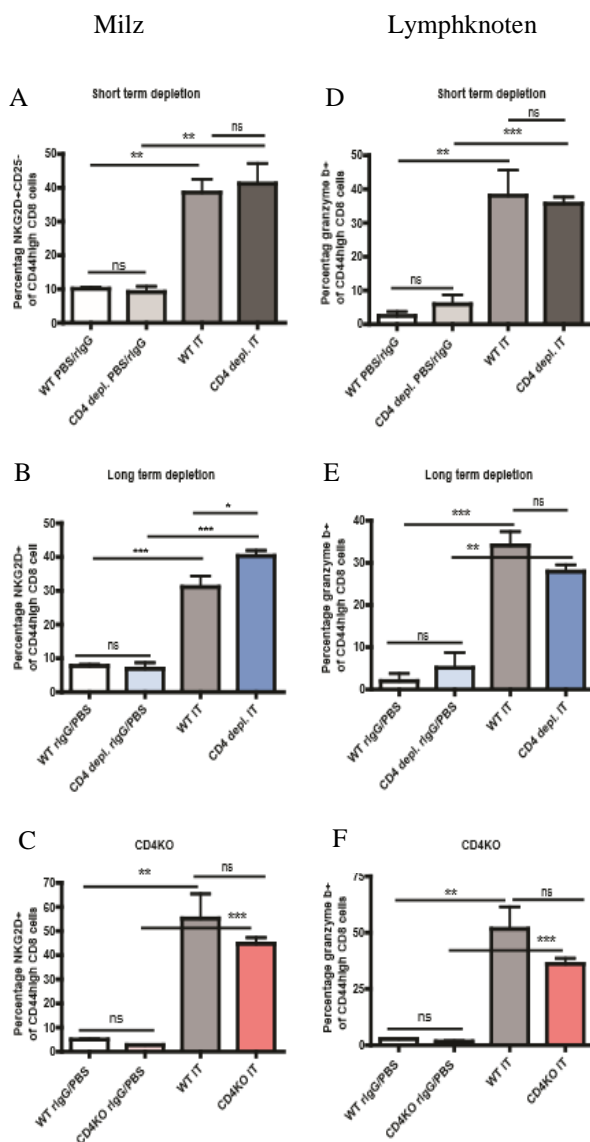


Abb. 3.3.3.: Unabhängig von den verschiedenen Depletionsmodellen wie A und D (Kurzzeitdepletion), B und E (Langzeitdepletion) oder C und F (CD4 Knockout-Mäuse) zeigt sich nach Immuntherapie eine Proliferation von NKG2D+CD25- CD8+ Gedächtnis-T-Zellen in Milz oder Lymphknoten.

Im Vergleich zu den WT-Mäusen war aber ein Unterschied im Phänotyp der proliferierenden T-Zellen feststellbar. Die CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen aus den CD4⁺ T-Zell-depletierten Mäusen exprimierten zusätzlich in noch signifikant höherem Maße PD-1 (Abb. 3.3.4.).

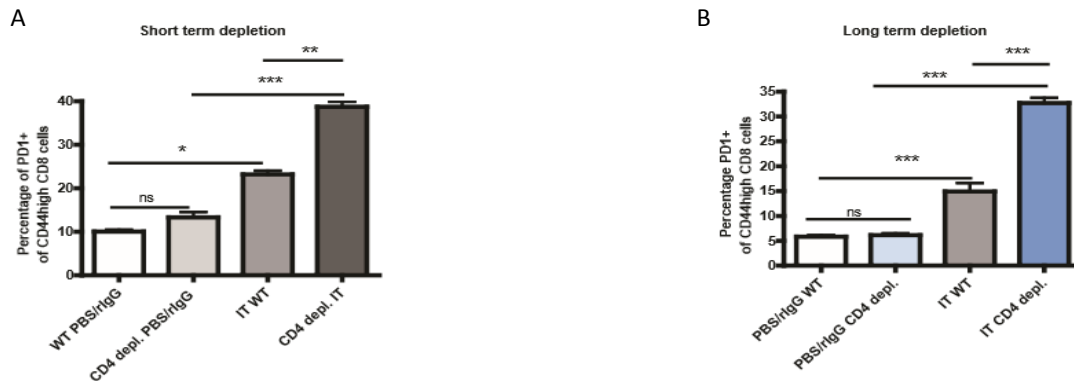


Abb. 3.3.4.: A) Gesteigerte PD-1-Expression auf CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen nach Immuntherapie in oder langfristig B) CD4-depletierten Mäusen (Monjazebe *et al.*, 2014).

Aus diesem Grund überprüften wir die Funktionalität der NKG2D⁺CD25⁺CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen. Hierzu untersuchten wir die Fähigkeit der Zellen, nach Stimulation IFN- γ zu bilden, die Expression von Granzyme B sowie ihre lytische Kapazität. Zwischen den CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen der CD4-depletierten und der WT-Mäuse zeigten sich keine Unterschiede in der Fähigkeit, Zytokine zu produzieren oder in der Tumor-lytischen Kapazität in vitro (Abb. 3.3.5.).

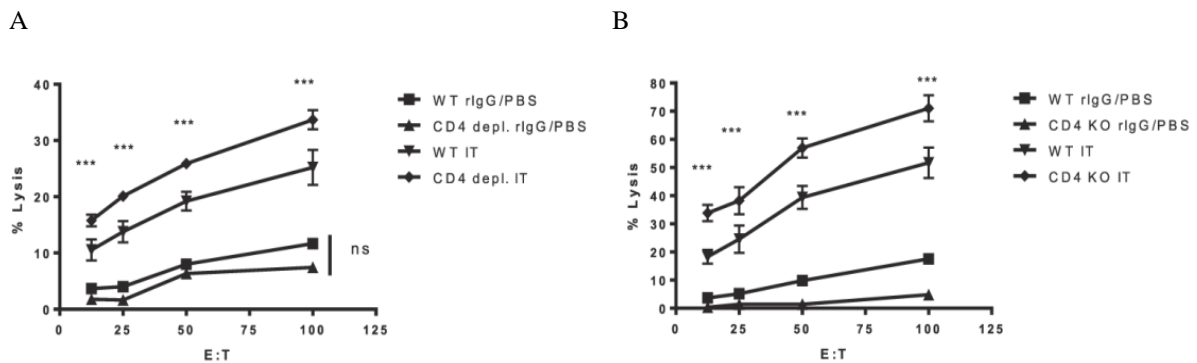


Abb. 3.3.5.: Die Kapazität der Tumorlyse nach Immuntherapie ist durch das Fehlen von CD4⁺ T-Zellen im A) Kurzzeitdepletionsmodell oder in den B) CD4 KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nicht beeinträchtigt (Monjazebe *et al.*, 2014).

Weiterhin war kein Unterschied in der Tumoreliminationsrate bzw. dem Überleben nach IT bei den CD4KO-Mäusen festzustellen. Der Anti-Tumor-Effekt in vivo war vergleichbar mit dem Effekt bei WT-Mäusen. Demzufolge ist PD-1 in diesem Modell eher als ein Marker für Effektor-Zellen zu werten (Monjazebe *et al.*, 2014).

Schlussfolgerung: CD4⁺ T-Zellen werden für die Aktivierung von Antigen-unspezifisch aktivierten CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen nicht benötigt.

3.4. Lokale Expansion von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen mit einem Antigen-unspezifischen Phänotyp und Antigen-unspezifischer Funktion nach Infektion mit Influenza (Publikation C)

Als Nächstes stellten wir uns die Frage, ob die CD8+ Gedächtnis-T-Zellpopulation auch in natürlichen Aktivierungszuständen in der Maus auftreten kann, wie z.B. bei Infektionen. Primäre virale Infektionen induzieren die Expansion von Antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen, die für die Elimination des Virus sowie die spezifische Immunität verantwortlich sind. Wir planten, die nach Infektion zu expandierenden CD8+ T-Zellen zu analysieren. Zu diesem Zweck infizierten wir Mäuse mit Influenzaviren und untersuchten die Organe. Die Infektion von bislang Influenza-naiven Mäusen führte zu einer ausgeprägten Proliferation von NKG2D+PD-1-CD25-CD44^{high}CD8+ T-Zellen, also CD8+ Gedächtnis-T-Zellen, in der Lunge der Mäuse. Diese Zellen waren schon ab dem 3. postinfektiösen Tag in der Lunge nachweisbar und expandierten stark ab dem 5. postinfektiösen Tag. Da die Bindung des TZR zur Expression von CD25+ und kurzfristig zur Expression von PD1 führt, nahmen wir an, dass auch diese Zellen Antigen-unspezifisch stimuliert wurden. Für die sogenannte Bystander-Aktivierung der CD8+ Gedächtnis-T-Zellen sprach auch, dass die Mäuse noch keinen Kontakt zu Grippeviren gehabt hatten und demzufolge bislang keine für diese Viren Antigen-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen ausgebildet haben konnten. Erst am 7. postinfektiösen Tag war eine wahrscheinlich Antigen-spezifisch stimulierte Immunantwort nachweisbar, da PD-1+CD25+CD8+ T-Zellpopulationen gefunden wurden.

Die frühen NKG2D+ CD25-PD-1-CD8+ Gedächtnis-T-Zellen waren nach der Infektion ausschließlich in der Lunge nachzuweisen, während sie zu keinem Zeitpunkt in den paratrachealen Lymphknoten oder in der Milz detektierbar waren (Abb. 3.4.1.).

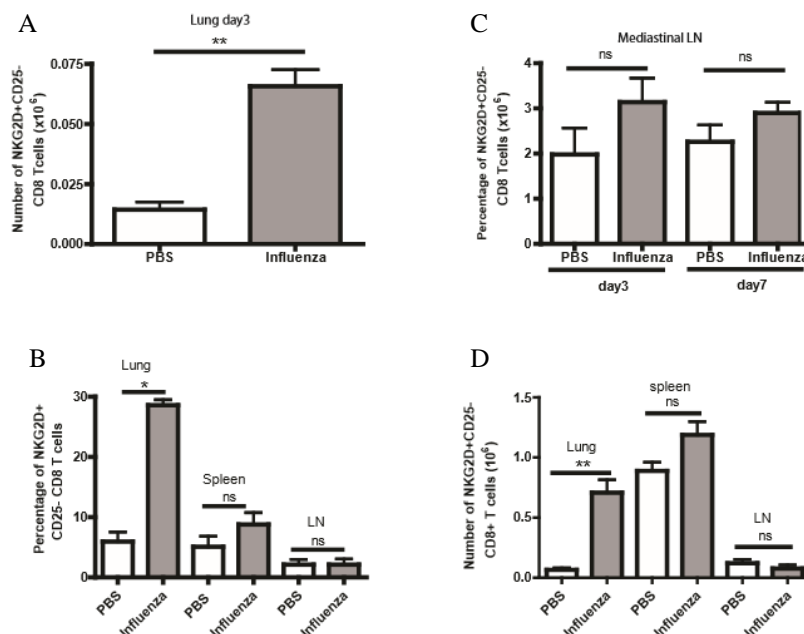


Abb. 3.4.1.: Ab dem dritten postinfektiösen Tag sind in der Lunge ein erhöhter A) absoluter bzw. B) relativer Anteil an Antigen- unspezifisch aktivierten CD25-NKG2D+ CD8+ Gedächtnis-T-Zellen nachzuweisen, aber nicht C) in den mediastinalen Lymphknoten und D) in der Milz, (Sckisel *et al.*, 2014).

Um die TZR-unabhängige Aktivierung dieser NKG2D+CD25-CD8+ Gedächtnis-T-Zellen weiter zu überprüfen, untersuchten wir die v β -Ketten des TZR dieser Zellen. Die v β -Ketten der Virus-spezifischen CD8+ Zellen auf H3N2 in C57BL/6-Mäusen sind von anderen Gruppen intensiv untersucht worden und gehören vorrangig zu der v β 8.3- oder der v β 7-Kette (Belz *et al.*, 2000; Deckhut *et al.*, 1993; La Gruta *et al.*, 2006; Moffat *et al.*, 2010). Wir konnten nachweisen, dass ein Teil der NKG2D+CD25-CD8+ Gedächtnis-T-Zellen die v β 5.1-Kette trug, die einen irrelevanten TZR markiert. Damit verdichteten sich die Hinweise, dass auch die in der Frühphase der Grippeinfektion proliferierenden CD8+ Gedächtnis-T-Zellen in der Tat Antigen-unspezifisch aktiviert wurden. Zur weiteren Analyse der möglichen Bystander-Aktivierung durch Infekte wurden CD8+ T-Zellen mit einem für Ovalbumin spezifischen TZR aus OT1-Mäusen in C57BL/6-Mäuse transferiert. Diese impften wir mit Ovalbumin, um die Zellen zu Gedächtnis-T-Zellen zu machen. Monate später wurden diese Mäuse mit Influenza infiziert. Es zeigte sich, dass diese OVA+CD8+ Gedächtnis-T-Zellen in der Lunge nach Influenzainfektion proliferierten und NKG2D exprimierten. Diese Zellen glichen vom Phänotyp den CD8+ Gedächtnis-T-Zellen, die nach Immuntherapie beobachtet wurden. Nach Immuntherapie waren diese CD8+ Gedächtnis-T-Zellen aber in jedem untersuchten Organ und nicht nur in der Lunge zu finden (Abb. 3.4.2). Dies legt den Schluss nahe, dass Antigen-unspezifisch aktivierte NKG2D+CD8+ Gedächtnis-T-Zellen eine Art Sofortschutz bieten, bevor die Antigen-spezifischen T-Zellen in ausreichender Menge vorliegen. Die Erkennung von mit Virus infizierten Zellen könnte über den NKG2D-Rezeptor erfolgen.

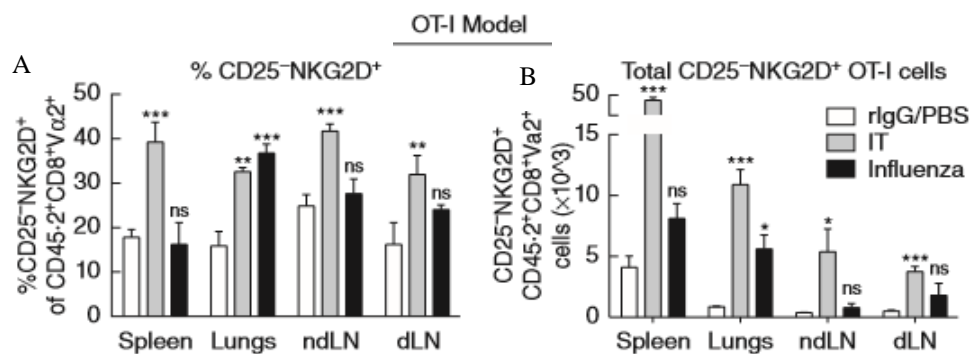


Abb. 3.4.2.: Eine relative A) sowie absolute B) Zunahme von Influenzaantigen-unspezifischen NKG2D+ CD25- CD8+ Gedächtnis-T-Zellen in OT1-Mäusen ist generalisiert nach Immuntherapie sowie in der Lunge nach Influenzainfektion zu beobachten (Sckisel *et al.*, 2014).

Um die Relevanz der Expression von NKG2D zur Virusabwehr zu überprüfen, erhielten mit Influenzaviren infizierte Mäuse jeden 2. Tag Anti-NKG2D-AK. Die mit NKG2D-AK behandelten Tiere hatten eine im Verlauf der Infektion signifikant höhere Viruslast als die unbehandelten Vergleichstiere (Abb. 3.4.3.), womit sich die Hypothese von der Schutzfunktion der Antigen-unspezifisch aktivierten CD8+ Gedächtnis-T-Zellen als Antigen-unspezifische Immunantwort erhärtete.

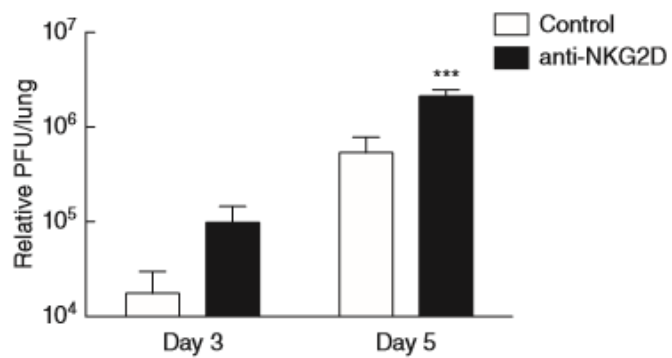


Abb. 3.4.3.: Die Hemmung von NKG2D führt zu einer höheren Viruslast in den Lungen von mit Influenza infizierten Mäusen (Sckisel *et al.*, 2014).

Schlussfolgerung: Die Antigen-unspezifisch aktivierten NKG2D⁺CD25⁺CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen treten auch bei akuten Infektionen auf und scheinen für die primäre Abwehr der Erreger eine relevante Rolle zu spielen, bevor die Antigen-spezifischen T-Zellen in ausreichender Zahl vorliegen.

3.5. Korrelation des Anteils der zirkulierenden CD45RO+CD8+ T-Zellen bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom mit dem Ansprechen der Therapie auf Ipilimumab (Publikation D)

Nachdem wir die Relevanz der Antigen-unspezifisch aktivierten Bystander CD8+ Gedächtnis-T-Zellen nach Immuntherapie in der Maus gezeigt hatten, wollten wir nun deren Rolle bei ICB im Menschen bestimmen. Hierzu untersuchten wir prospektiv 30 Patienten mit metastasiertem Melanom, bei denen die CD8+ T-Zellen im Blut vor den ersten 4 geplanten Zyklen der Behandlung mit Ipilimumab oder Pembrolizumab sowie vor dem ersten posttherapeutischen Staging phänotypisiert wurden (Abb. 3.5.1.).

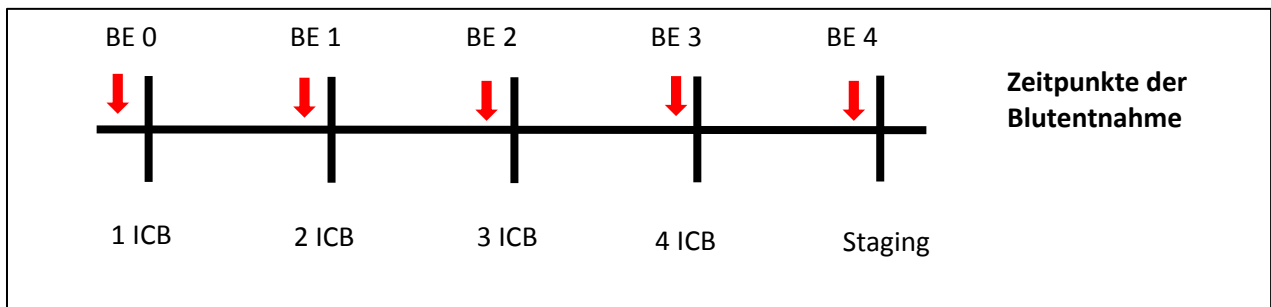


Abb. 3.5.1.: Die Blutentnahme erfolgte jeweils 1 Tag vor jedem Behandlungszyklus mit Immuncheckpoint-Blockade (ICB) bzw. 1 Tag vor dem geplanten Staging.

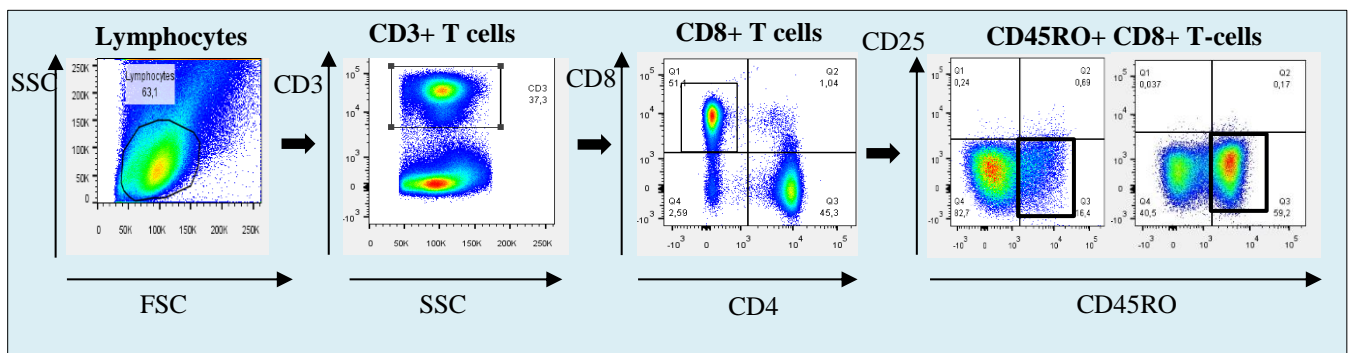


Abb. 3.5.2.: Die Blutzellen wurden auf CD3, CD8 sowie CD45RO gefärbt, um die CD8+ Gedächtnis-T-Zellen zu identifizieren (Tietze *et al.*, 2017a).

Die Analyse der CD8+ T-Zellen unter den „peripheral blood monocyctic cells“ (PBMCs) ergab, dass sich die Patienten signifikant in dem Anteil von CD8+ T-Zellen unterschieden, die CD45RO+ waren. CD45RO ist der Marker für Gedächtnis-T-Zellen im Menschen. In gesunden Erwachsenen beträgt der Anteil an Gedächtnis-T-Zellen von der gesamten Menge der CD8+ T-Zellen etwa 30%. Dies war bei rund der Hälfte unserer Patienten auch der Fall. Bei den anderen Patienten betrug der Anteil der Gedächtnis-T-Zellen von den CD8+ T-Zellen weniger als 30% (Abb. 3.5.3.).

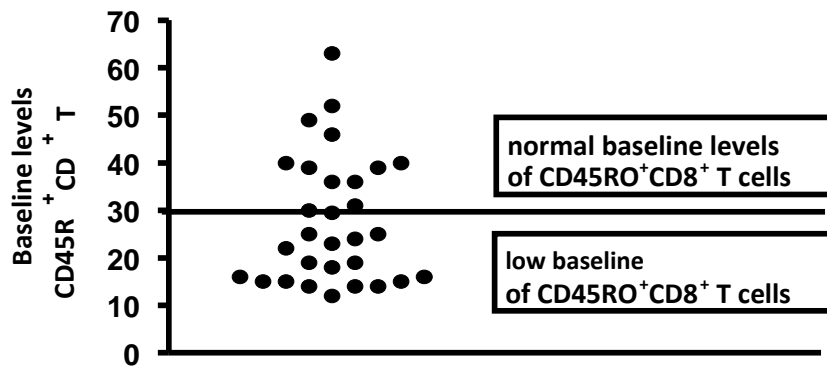


Abb. 3.5.3.: Patienten konnten anhand der normalen bzw. niedrigen Basisspiegel der CD45RO+CD8+ T-Zellen in 2 Gruppen eingeteilt werden (Tietze *et al.*, 2017a).

Wir untersuchten, ob im Menschen - wie in der Maus - die ICB zu einer vermehrten Proliferation der CD8+ Gedächtnis-T-Zellen führt. Aber im Gegensatz zur Immuntherapie in der Maus proliferierten die menschlichen CD8+ Gedächtnis-T-Zellen nicht, sondern blieben während der gesamten ICB konstant (Abb. 3.5.4.).

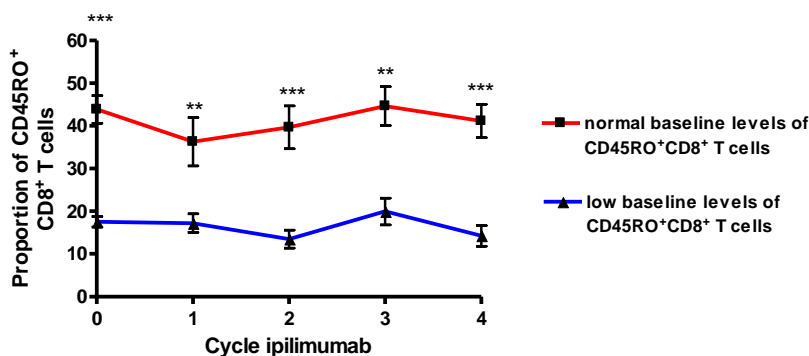


Abb. 3.5.4.: Der Anteil der CD8+ Gedächtnis-T- Zellen blieb im Verlauf der ICB unverändert (Tietze *et al.*, 2017a)

Da die ICB keinen Einfluss auf den Anteil oder die Menge der CD8+ Gedächtnis-T-Zellen zu haben schien, untersuchten wir, ob der Basisspiegel vor der Therapie eventuell mit dem Ansprechen korrelierte. Als Ansprecher wurden Patienten mit vollständigem Ansprechen (CR), mit partiellem Ansprechen (PR) sowie mit stabiler Erkrankung (SD) gewertet. In der Tat zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zum Basisspiegel von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen mit dem Ansprechen auf die Therapie mit Ipilimumab, aber nicht mit Pembrolizumab (Abb. 3.5.5.).

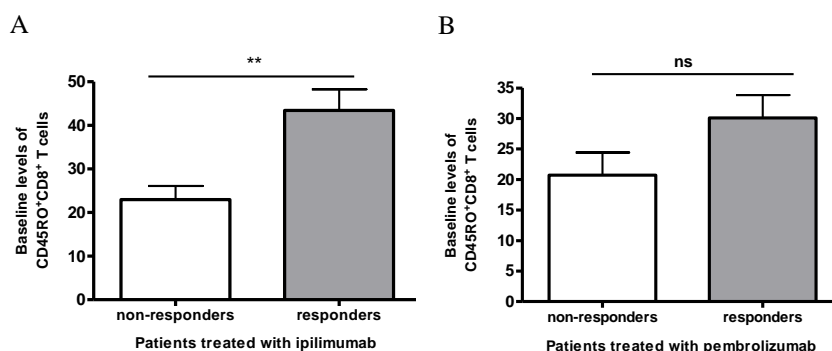


Abb. 3.5.5.: Der Anteil an CD8+ Gedächtnis-T-Zellen war signifikant mit dem Ansprechen auf A) Ipilimumab aber nicht auf B) Pembrolizumab korreliert (Tietze *et al.*, 2017a).

Weitere Analysen ergaben, dass die mit Ipilimumab therapierten Patienten in drei Gruppen eingeteilt werden konnten: Patienten mit einem normalen Basisspiegel von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen, die auf die Therapie ansprachen, Patienten mit einem normalen Basisspiegel, die auf die Therapie nicht ansprachen sowie Patienten mit einem zu niedrigen Basisspiegel, die nicht auf die Therapie ansprachen. Keiner der zwölf Patienten mit einem niedrigen Basisspiegel von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen sprach auf die Therapie mit Ipilimumab an (Abb. 3.5.6.), also lag in unserer Kohorte der prädiktive Wert des Versagens der Therapie mit Ipilimumab bei Patienten mit zu niedrigem Basisspiegel der CD8+ Gedächtnis-T-Zellen bei 100%. Dies entsprach etwa 80% der gesamten Anzahl der Nichtansprecher. Retrospektiv betrachtet hätten wir, wenn wir nur Patienten mit normalen Basisspiegeln von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen therapiert hätten, in unserer Kohorte eine beeindruckende Ansprechrate von ca. 67% erreichen können.

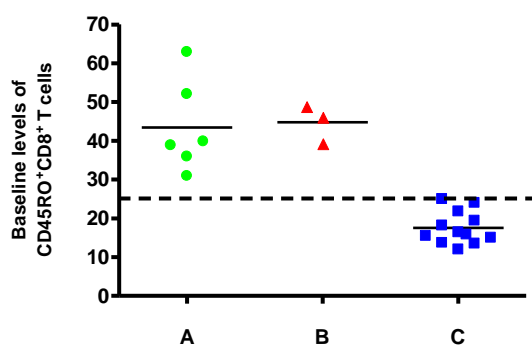


Abb. 3.5.6.: Patienten mit normalen Basisspiegel von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen sprachen meistens (Gruppe A) aber nicht immer (Gruppe B) auf die Therapie mit Ipilimumab an. Patienten mit niedrigen Basisspiegeln sprachen nie auf die Therapie mit Ipilimumab an (Gruppe C) (Tietze *et al.*, 2017a).

Wir waren nun daran interessiert zu bestimmen, welcher Typ CD8+ Gedächtnis-T-Zellen für die Prädiktion des Ansprechens auf Ipilimumab relevant war. Wir analysierten die Expression des Chemokinrezeptors CCR7, der die zentralen CD8+ Gedächtnis-T-Zellen markiert. Die weitere Phänotypisierung der CD8+ Zellen ergab, dass sich der Anteil an CCR7+CD8+ zentralen Gedächtnis-T-Zellen in den Patienten nicht unterschied, es sich also bei den Zellen um CCR7-CD8+ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen handelte (Abb. 3.5.7.).

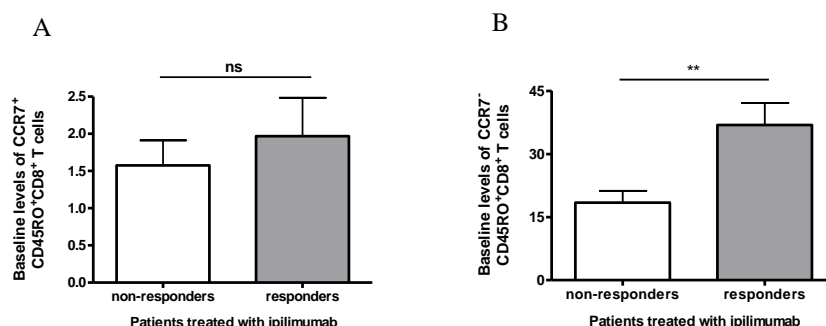


Abb. 3.5.7.: A) Der Anteil der zentralen CD8+ Gedächtnis- T-Zellen unterschied sich nicht bei Ansprechern und Nichtansprechern auf Ipilimumab-Therapie B) Der Anteil an Effektor CD8+ Gedächtnis-T- Zellen war signifikant unterschiedlich bei Ansprechern und Nichtansprechern auf Ipilimumab-Therapie (Tietze *et al.*, 2017a; Tietze *et al.*, 2017b).

Als Nächstes analysierten wir, ob die ICB zu einer Antigen-unspezifischen Aktivierung der CD8+ Gedächtnis-T-Zellen führte bzw. ob sich die Aktivierung zwischen den Patienten mit normalen oder zu niedrigen Basisspiegeln von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen unterschied. Hierzu wurden die Zellen auf die Expression von HLA-DR und CD25 hin untersucht. In Patienten mit einem normalen Basisspiegel von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen waren schon vor Therapie signifikant mehr Antigen-unspezifisch aktivierte CD8+ T-Zellen, also HLA-DR+CD25-CD8+ T-Zellen, nachweisbar als bei Patienten mit zu niedrigen Basisspiegeln. Der Anteil stieg zudem bei Patienten mit normalem Basisspiegel von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen unter Ipilimumabtherapie signifikant an, während er sich bei den Patienten mit zu niedrigem Basisspiegel, die alle nicht auf die Immuntherapie ansprachen, nicht änderte (Abb. 3.5.8.).

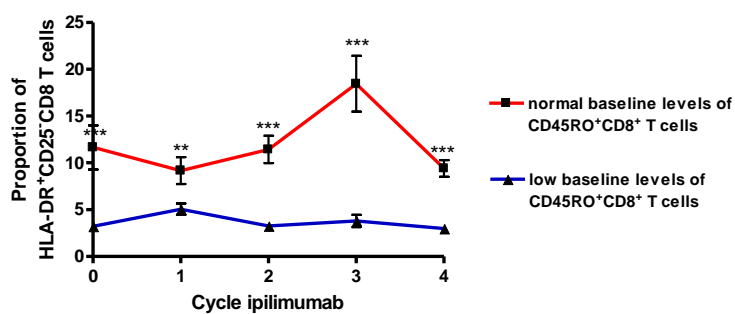


Abb. 3.5.8.: Der Anteil von Antigen-unspezifisch stimulierten HLA-DR+CD25-CD8+ T-Zellen war signifikant höher in Patienten mit normalen Basisspiegeln von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen und stieg im Verlauf der Therapie zusätzlich signifikant an (Tietze *et al.*, 2017a).

Es konnte auch eine HLA-DR+CD25+ sowie eine HLA-DR-CD25+ Subpopulation identifiziert werden. Allerdings waren diese Populationen sehr klein und veränderten sich nicht signifikant während der Ipilimumabtherapie (Abb. 3.5.9.). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass auch hier die Antigen-unspezifisch aktivierten CD8+ Gedächtnis-T-Zellen zur Tumorabwehr beitragen.

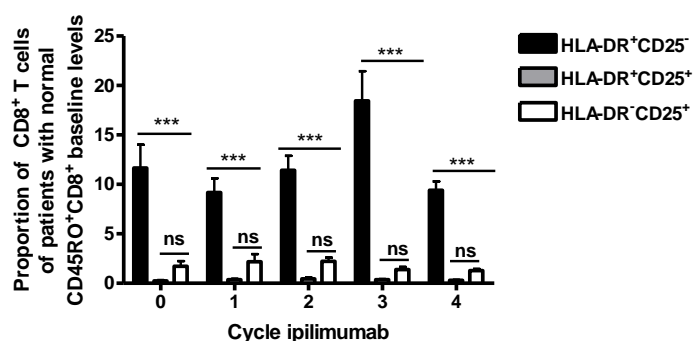


Abb. 3.5.9.: Der Anteil von HLA-DR+CD25-CD8+ T-Zellen war signifikant höher als der Anteil von HLA-DR+CD25+ oder HLA-DR-CD25+ CD8+ T-Zellen in Patienten mit normalen Basisspiegeln von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen (Tietze *et al.*, 2017a).

Um die Antigenspezifität dieser Zellen weiter zu analysieren, verwendeten wir ein „melanoma antigen recognized by T cells-1“ (MART-1)-Pentamer, das MART-1-spezifische T-Zellen anzufärben vermag. MART-1 ist ein häufig vorkommendes Melanomantigen. Da MART-1-Pentamere an spezifische HLA-Klassen gebunden sind, entschieden wir uns für das HLA-A2 als Bindungs-HLA, da dies das in

der kaukasischen Bevölkerung häufigste Antigen ist. Die Patienten wurden zunächst auf HLA-A2-Expression untersucht und über die Hälfte (52%) war HLA-A2 positiv. Wir wählten den für das Epstein-Barr-Virus (EBV) spezifischen TZR als Vergleich, da über 95% der erwachsenen Bevölkerung messbare Antikörper gegen EBV im Blut haben.

Die Analyse auf MART-1+ CD8+ T-Zellen sowie EBV+ CD8+ T-Zellen bei diesen Patienten zeigte, dass es zum einen keine signifikanten Unterschiede in beiden Populationen gab und zum anderen keine signifikante Proliferation unter der Therapie mit Ipilimumab festzustellen war. Auch war kein Unterschied zwischen den Patienten mit normalen und erniedrigten Basisspiegeln von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen festzustellen (Abb. 3.5.10.).

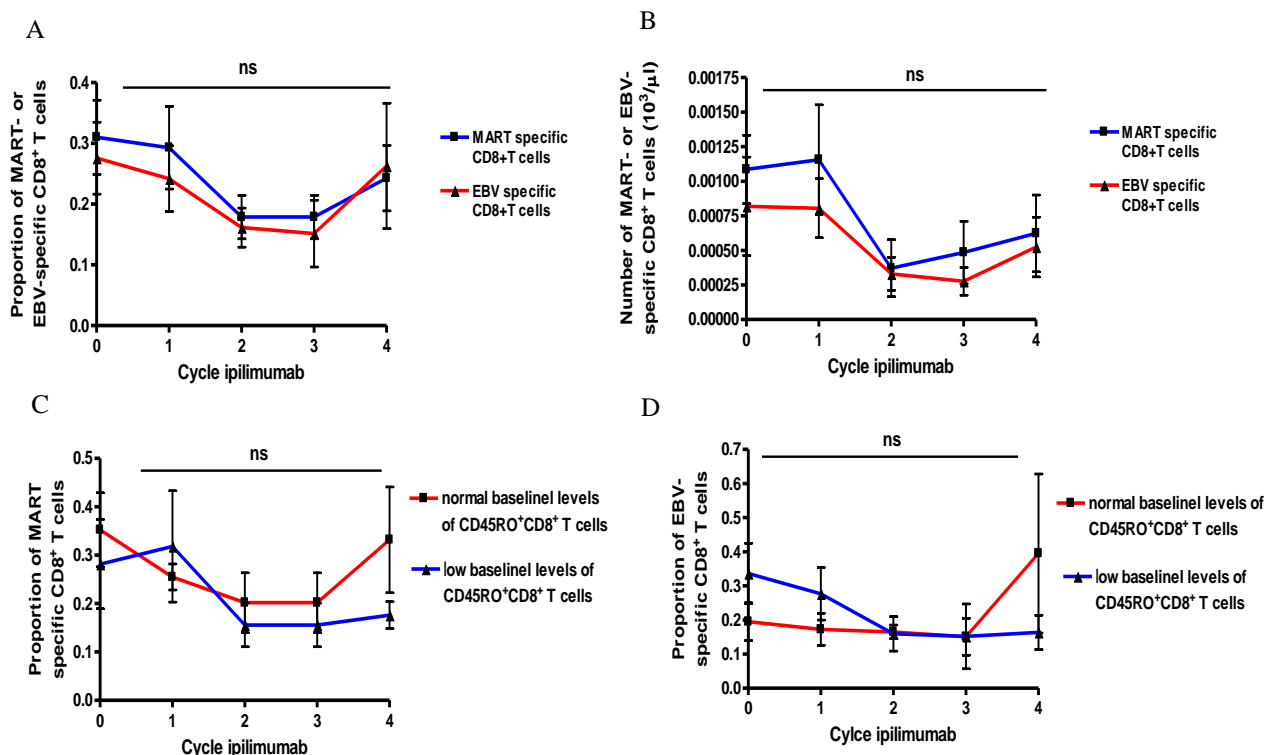


Abb. 3.5.10.: Kein Unterschied des A) relativen und des B) absoluten Anteils vor oder unter Therapie mit Ipilimumab zwischen MART-1 und EBV spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Kein Unterschied im Anteil von C) MART-1 und D) EBV spezifischen CD8⁺ T-Zellen zwischen Patienten mit normalen oder niedrigen Basisspiegeln von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen (Tietze *et al.*, 2017a).

Wir prüften dann, ob die Patienten mit einem normalen CD8⁺ Gedächtnis-T-Zell Basisspiegel ein unterschiedliches Langzeitüberleben im Vergleich zu den Patienten mit niedrigem Basispegel aufwiesen. In der Tat war ein signifikanter Überlebensvorteil bei Patienten mit normalem Basisspiegel nach Ipilimumabtherapie festzustellen. Aber auch bei mit Pembrolizumab therapierten Patienten zeigten die Patienten mit normalem Basisspiegel von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen einen Trend zum längeren Überleben (Abb. 3.5.11.).

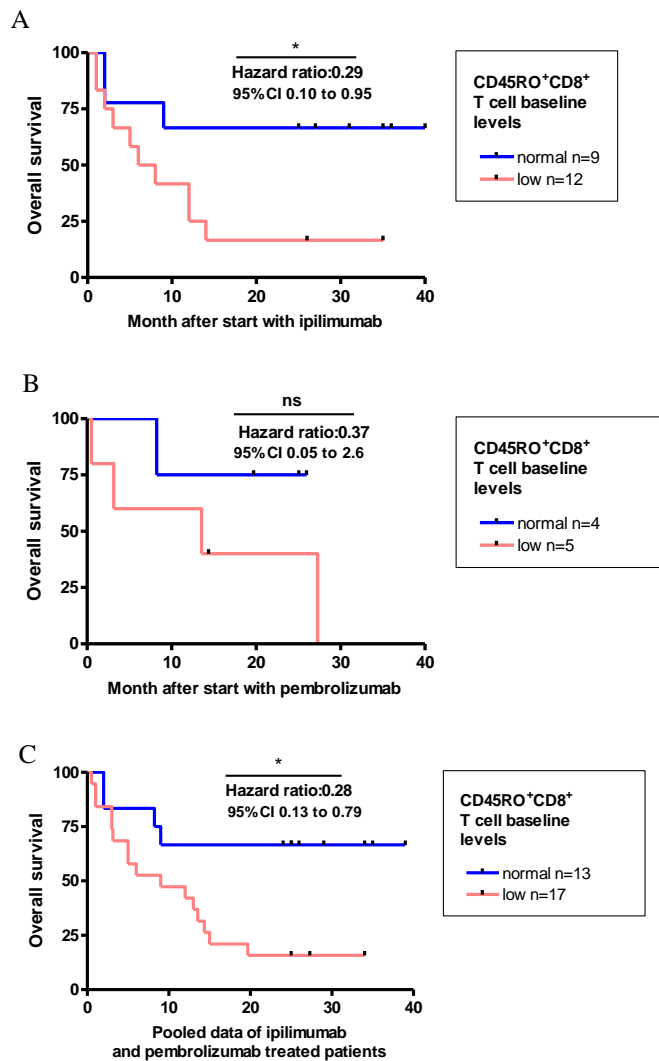


Abb. 3.5.11.: A) Patienten mit einem normalen Basisspiegel von CD8+ Gedächtnis T-Zellen und Ipilimumabtherapie überlebten signifikant länger als Patienten mit einem niedrigen Basisspiegel von CD8+ Gedächtnis-T-Zellen. B) Eine Tendenz hierfür zeigte sich auch bei den mit Pembrolizumab therapierten Patienten, aber hier war der Unterschied nicht signifikant. C) Eine gepoolte Analyse des Überlebens von mit Ipilimumab und Pembrolizumab therapierten Patienten zeigt eine noch größere Signifikanz zugunsten der Patienten mit normalen CD8+ Gedächtnis-T-Zellen (Tietze *et al.*, 2017a).

Schlussfolgerung: Der Basisspiegel der CD8+ Gedächtnis-T-Zellen scheint ein hochsignifikanter Marker für das Ansprechen auf die Therapie mit Ipilimumab und ebenfalls ein Marker für längeres Überleben nach der Therapie zu sein. Die unter Therapie Antigen-unspezifisch aktivierten CD8+ Gedächtnis-T-Zellen im Menschen scheinen außerdem relevant für das Ansprechen auf die Therapie mit Ipilimumab zu sein, der genaue Wirkmechanismus muss allerdings noch geklärt werden.

3.6. Niedrige NK-Zell-Anteile im peripheren Blut als prädiktiver Wert für positives Ansprechen auf Ipilimumab in der Therapie des metastasierten Melanoms (Publikation E)

Es wurde vielfach beobachtet, dass NK-Zellen in der Tumorabwehr eine tragende Rolle spielen. Allerdings gibt es sehr wenige Daten zu der Bedeutung von NK-Zellen unter ICB bei malignem Melanom. Daher prüften wir prospektiv in 32 Melanompatienten, von denen 23 mit Ipilimumab und 9 mit Pembrolizumab therapiert wurden, ob die Anteile der CD56+ Zellen (NK-Zellen) in den PBMCs im Blut einen Einfluss auf das Ansprechen auf Immuntherapie haben. Ein Anteil von 5-20% von NK-Zellen in den PMBCs im Blut gilt als normal. Die Analyse des Anteils der NK-Zellen in den PBMCs ergab, dass die Patienten entweder normale oder niedrige NK-Zell-Anteile im Blut aufwiesen. In 17 (53%) der Patienten war der NK-Zell-Anteil normal und in 15 (47%) der Patienten war der NK-Zell-Anteil kleiner als 5% und damit zu gering. Als Nächstes untersuchten wir, ob die Therapie mit ICB zur Zunahme des Anteils an NK-Zellen im Blut führte. Nur Patienten mit einem Ausgangswert von weniger als 5% NK-Zellen wiesen einen signifikanten Anstieg der NK-Zellen unter ICB auf, wohingegen Patienten mit einem normalen Anteil keine signifikante Änderung zeigten (Abb. 3.6.1.).

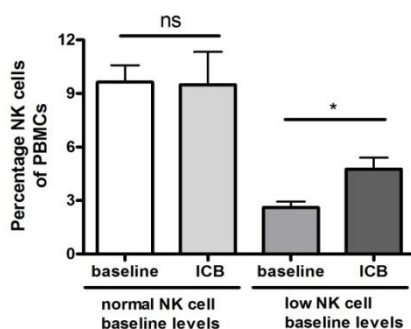


Abb. 3.6.1.: Bei Patienten mit normaler NK-Zell-Population bleibt der Anteil unter ICB-Therapie konstant, während er bei Patienten mit niedriger NK-Zell-Population signifikant zunimmt (Tietze *et al.*, 2016).

Wir korrelierten dann den Anteil der NK-Zellen mit dem Ansprechen auf die ICB-Therapie. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem NK-Zell-Anteil im Blut vor Therapie und dem Ansprechen auf Ipilimumab, aber nicht auf Pembrolizumab. Überraschenderweise sprachen Patienten mit einem prätherapeutisch zu geringen NK-Zell-Anteil der PBMCs signifikant häufiger auf die Therapie an als Patienten mit normalem NK-Zell-Anteil (Abb. 3.6.2.).

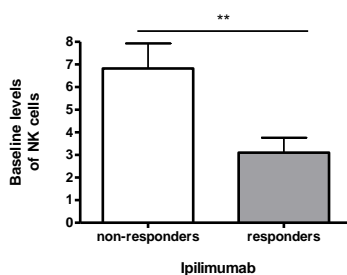


Abb. 3.6.2.: Nichtansprecher auf Ipilimumab haben einen signifikant höheren prozentualen Anteil von NK-Zellen in den PBMCs als Ansprecher (Tietze *et al.*, 2016).

Als Nächstes untersuchten wir einen möglichen Zusammenhang des NK-Zell-Anteils mit der Tumorlast, die wir anhand der Anzahl der betroffenen Organe definierten. Es zeigte sich, dass der NK-Zell-Anteil mit zunehmender Tumorlast zunahm. So hatten Patienten mit zwei oder mehr betroffenen

Organen einen signifikant höheren Anteil an NK-Zellen der PBMCs als Patienten, bei denen nur ein Organ betroffen war (Abb. 3.6.3.).

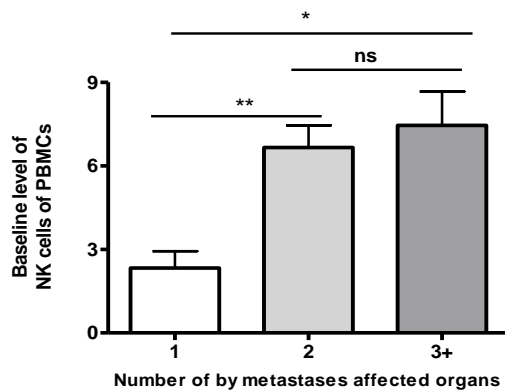


Abb. 3.6.3.: Der prozentuale Anteil an NK-Zellen in PBMCs nimmt mit der Anzahl der von Melanom betroffenen Organe zu (Tietze *et al.*, 2016).

Wir analysierten nun die Relevanz der NK-Subpopulationen auf das Ansprechen auf die ICB. NK-Zellen im Menschen können, je nachdem ob sie wenig oder viel CD56 auf der Oberfläche tragen, in eine CD56^{dim} und CD56^{bright} Population eingeteilt werden (Abb. 3.6.4).

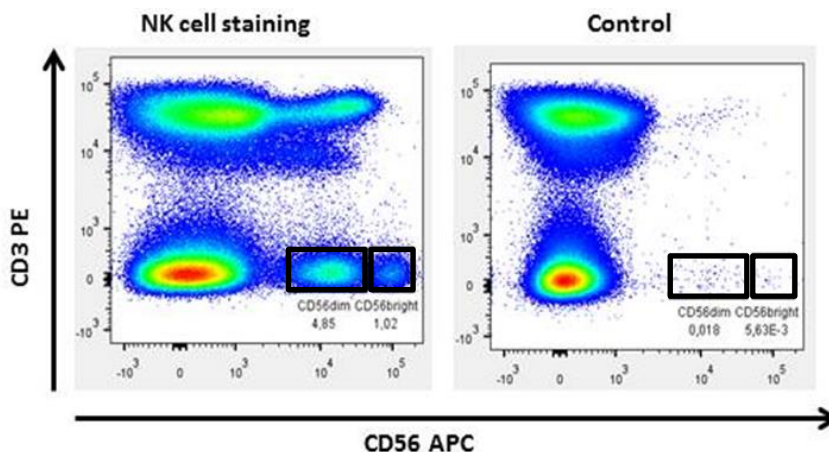


Abb. 3.6.4.: FACS-Färbung der NK-Zellen mit Anti-CD56-Antikörper (Tietze *et al.*, 2016).

Die Hauptaufgabe der CD56^{bright} NK-Zellen ist die Produktion von Zytokinen, während sich die CD56^{dim} NK-Zellen durch eine starke direkte Zytotoxizität auszeichnen. Der Anteil an CD56^{dim} NK-Zellen im Blut beträgt ca. 90%. Demzufolge definierten wir einen Anteil von 4,5% der CD56^{dim} NK-Zellen der PBMCs als normal und einen geringeren Anteil als zu niedrig. Wie auch bei der Untersuchung der gesamten NK-Zellen hatten hier 17 Patienten einen normalen Anteil an CD56^{dim} NK-Zellen und 15 Patienten einen zu niedrigen Anteil. Unter/nach ICB änderte sich der Anteil der CD56^{dim} NK-Zellen bei Patienten mit normalen Ausgangswerten nicht, aber bei Patienten mit zu niedrigen Ausgangswerten stieg der Anteil der CD56^{dim} NK-Zellen unter ICB signifikant an. Auch der Anteil der CD56^{dim} NK-Zellen der PBMCs im Blut korrelierte mit der Tumorlast der Patienten. Er zeigte einen signifikanten Anstieg bei höherer Anzahl von mit Melanom betroffenen Organen.

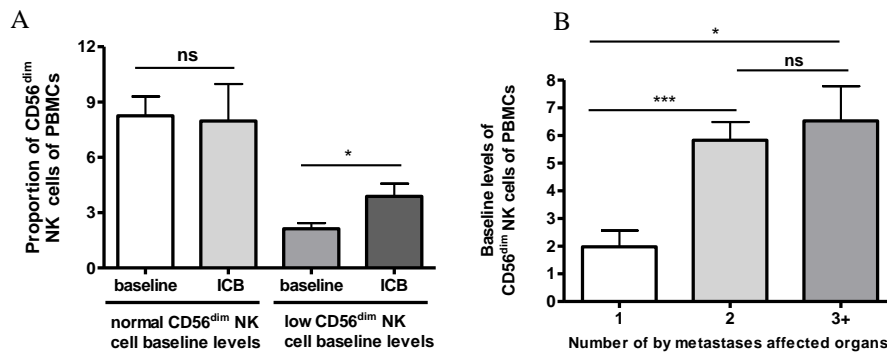


Abb. 3.6.5.: A) Unter der Therapie mit Ipilimumab nimmt der Anteil an CD56^{dim} NK-Zellen bei Patienten mit niedrigem NK-Zell-Anteil signifikant zu. B) Der Anteil an CD56^{dim} NK-Zellen in den PBMCs steigt mit zunehmender Organmetastasierung (Tietze *et al.*, 2016).

Die Ansprecher auf Ipilimumab hatten einen signifikant geringeren Ausgangswert der CD56^{dim} NK-Zellen als die Nichtansprecher, allerdings passten sich diese Werte im Laufe der Therapie aneinander an (Abb. 3.6.6.).

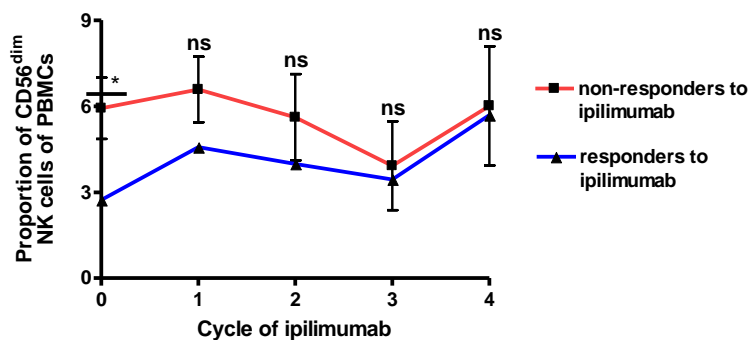


Abb. 3.6.6.: Der Anteil der CD56^{dim} NK-Zellen von Ansprechern und Nichtansprechern passt sich im Verlauf der Ipilimumabtherapie aneinander an (Tietze *et al.*, 2016).

CD56^{bright} NK-Zellen findet man nur zu einem sehr geringen Anteil im Blut. Der normale Anteil beträgt 0,0-0,7% von allen PBMCs. Um die Mengen an CD56^{bright} NK-Zellen im Blut zu bewerten, definierten wir einen Anteil der PBMCs von kleiner 0,7% als normal und größer 0,7% als erhöht. 17 Patienten hatten einen normalen Basiswert von CD56^{bright} NK-Zellen, während 15 der Patienten einen erhöhten Ausgangswert aufwiesen. Interessanterweise waren die Patienten mit niedrigem CD56^{bright} NK-Zell-Anteil nicht dieselben, die einen niedrigen CD56^{dim} NK-Zell-Anteil aufwiesen. Die Anteile reichten von 0,8 bis 16,8%. Der Anteil der CD56^{bright} NK-Zellen änderte sich während der Immuntherapie nicht und zeigte auch keinen Zusammenhang mit der Anzahl der von Metastasen betroffenen Organsysteme (Abb. 3.6.7.).

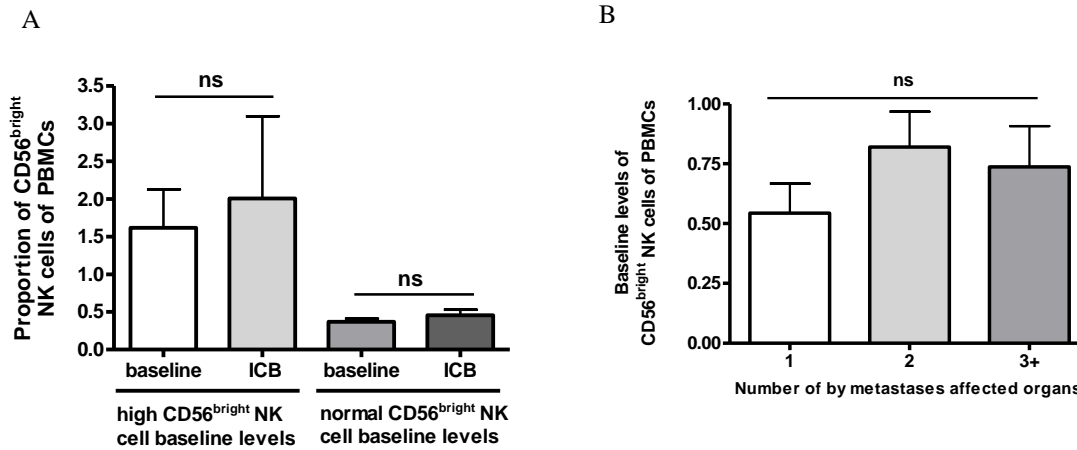


Abb. 3.6.7.: A) Der Anteil der CD56^{bright} NK-Zellen änderte sich im Verlauf der ICB nicht. B) Es war kein Zusammenhang zwischen den Ausgangswerten von CD56^{bright} NK-Zellen der PBMCs und dem Organbefall feststellbar (Tietze *et al.*, 2016).

Es war allerdings auch hier ein signifikanter Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Ipilimumab feststellbar. Patienten mit niedrigem und normalem Anteil an CD56^{bright} NK-Zellen von den PBMCs vor Therapiebeginn zeigten ein signifikant besseres Ansprechen auf die Therapie mit Ipilimumab als Patienten mit zu hohen Werten.

Im Laufe der Therapie war kein Unterschied mehr bezüglich des Anteiles der CD56^{bright} NK-Zellen zwischen Ansprechern und Nichtansprechern auf die Therapie mit Ipilimumab feststellbar. Abb. 3.6.8.).

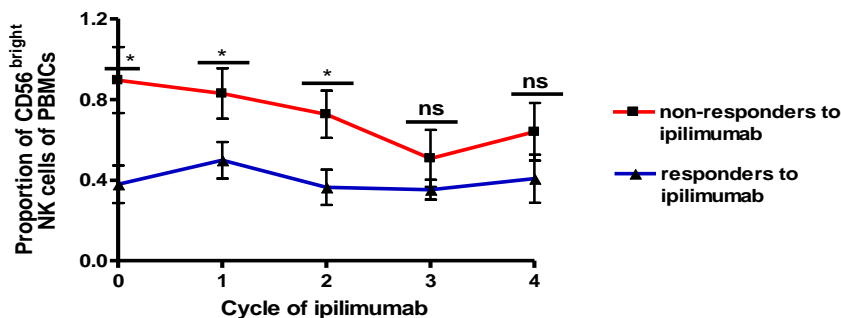


Abb. 3.6.8.: Der Anteil der CD56^{bright} NK-Zellen von Ansprechern und Nichtansprechern passt sich im Verlauf der Ipilimumabtherapie aneinander an (Tietze *et al.*, 2016).

Als Nächstes untersuchten wir die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf den Untergruppen der NK-Zellen. Dieser Rezeptor befähigt die NK-Zellen, in lymphoide Organe zu migrieren. Während bei den Patienten mit normalen oder hohen Anteilen von CD56^{bright} NK-Zellen vor Therapie kein Unterschied in der CCR7-Expression festzustellen war, zeigte die CCR7-Expression bei Patienten mit normalen oder erniedrigten Anteilen von CD56^{dim} NK-Zellen eine Entwicklung. So nahm die Expression von CCR7 bei Patienten mit normalen Anteilen von CD56^{dim} NK-Zellen unter der Therapie mit Ipilimumab signifikant ab, wohingegen die Expression von CCR7 auf den CD56^{dim} NK-

Zellen in Patienten mit niedrigen Anteilen in den PBMCs unter Therapie mit Ipilimumab unverändert blieb (Abb. 3.6.9.).

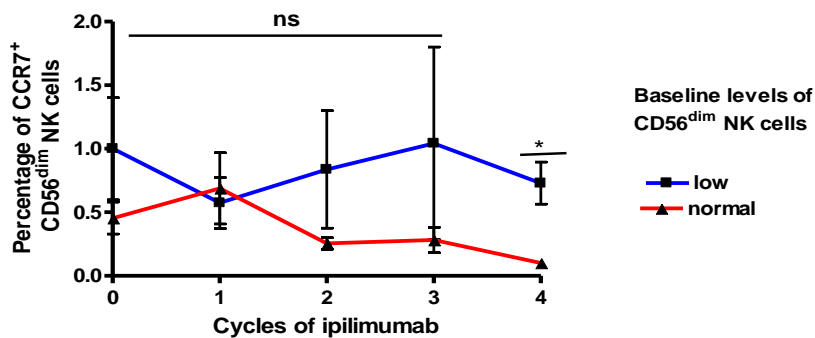


Abb. 3.6.9.: Bei Patienten mit einem normalen Anteil von CD56^{dim} NK-Zellen sinkt die CCR7-Expression auf den NK-Zellen im Verlauf der Therapie mit Ipilimumab signifikant ab (Tietze *et al.*, 2016).

Die Expression des Aktivierungsmarker NKG2D wurde ebenfalls analysiert. Der Anteil von NKG2D+ CD56^{dim} NK-Zellen unterschied sich vor und unter ICB in den Patienten mit erniedrigten oder normalen Ausgangswerten nicht, aber zwischen den Patienten mit normalen oder erhöhten Anteilen von CD56^{bright} NK-Zellen konnte vor Therapiebeginn mit Ipilimumab ein Unterschied im Aktivierungsgrad festgestellt werden. So waren die CD56^{bright} NK-Zellen in Patienten mit erhöhten Ausgangswerten vor der Therapie signifikant stärker aktiviert, wobei diese Aktivierung unter Therapie kontinuierlich abnahm. Die CD56^{bright} NK-Zellen von Patienten mit normalen CD56^{bright} NK-Zell-Ausgangswerten hingegen hatten vor Beginn der Therapie eine niedrigere NKG2D-Expression, die aber im Verlauf der Therapie mit Ipilimumab immer weiter anstieg (Abb. 3.6.10.).

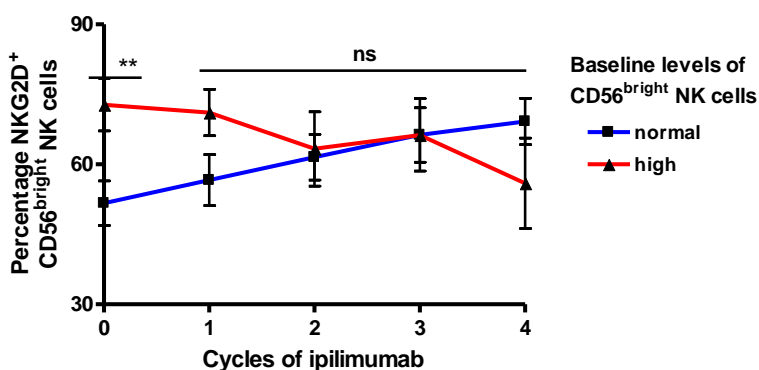


Abb. 3.6.10.: Der Anteil der NKG2D+ CD56^{bright} NK-Zellen steigt im Verlauf der Ipilimumabtherapie bei Patienten mit normalen Basisleveln an (Tietze *et al.*, 2016).

Die NKG2D-Expression zeigte auch einen Zusammenhang mit der Anzahl der von Metastasen betroffenen Organe. In Patienten mit nur einem betroffenen Organsystem war der Anteil an NKG2D+ und damit aktivierten NK-Zellen signifikant höher als in Patienten mit mehreren betroffenen Organsystemen. Dieser Effekt konnte auch für die CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zell-Untergruppen nachgewiesen werden (Abb. 3.6.11.).

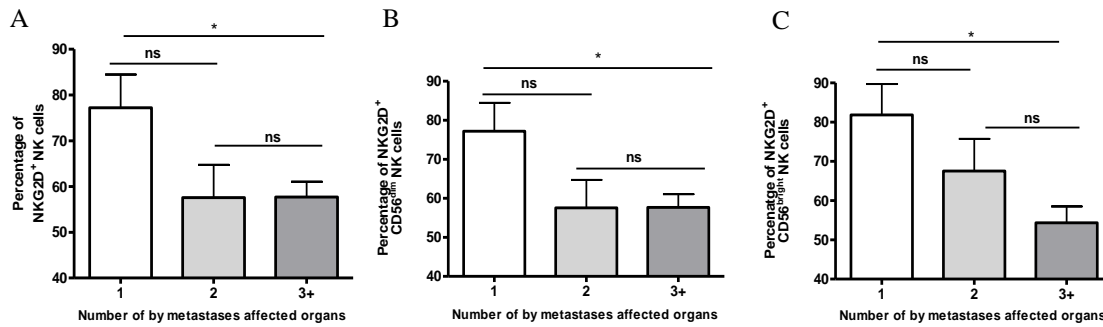


Abb. 3.6.11.: Die Expression von NKG2D auf A) NK-Zellen sowie auf den B) CD56^{dim} und C) CD56^{bright} NK-Zell Subpopulationen sinkt mit zunehmendem Organbefall (Tietze *et al.*, 2016).

Die Untersuchung der Überlebensdauer nach Therapiebeginn zeigte, dass die Analyse der Untergruppen einen prädiktiven Wert für das Überleben hat. Patienten mit einem normalen Anteil von CD56^{dim} NK-Zellen der PBMCs vor Therapie zeigten einen tendenziellen Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit erhöhten Anteilen vor Therapie. Ein hochsignifikanter Überlebensvorteil konnte für Patienten mit normalen CD56^{bright} Anteilen der PBMCs vor Therapie mit Ipilimumab im Vergleich zu Patienten mit erhöhten Anteilen nachgewiesen werden (Abb. 3.6.12).

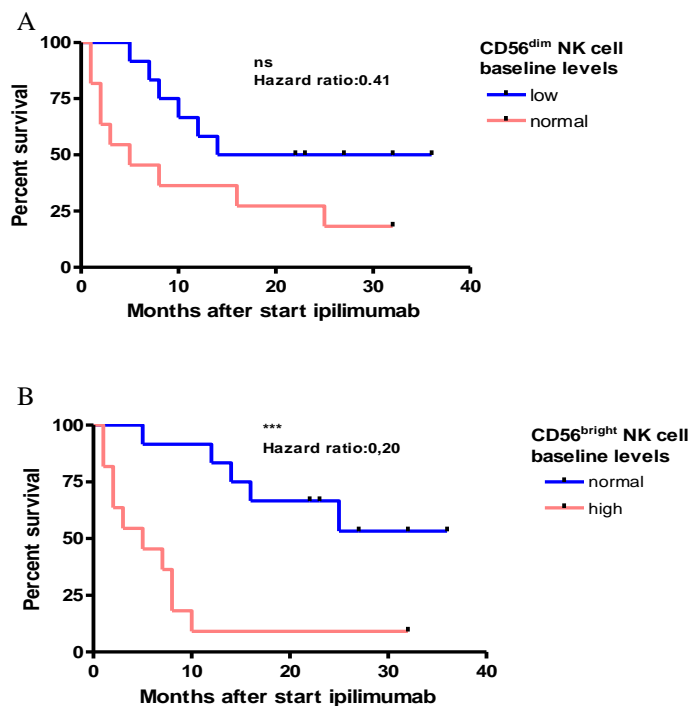


Abb. 3.6.12.: A) Patienten mit niedrigen Anteilen von CD56^{dim} NK-Zellen haben tendenziell eine höhere Überlebensrate als Patienten mit normalen Anteilen vor Therapie. B) Patienten mit normalen Anteilen von CD56^{bright} NK-Zellen haben eine hochsignifikanter höhere Überlebensrate als Patienten mit prätherapeutischen hohen Anteilen (Tietze *et al.*, 2016).

Schlussfolgerung: Bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom steigt der Anteil an NK-Zellen von den PBMCs mit Zunahme der Tumorlast, aber der Aktivierungsgrad nimmt ab. Ein niedriger Anteil an NK-Zellen oder an den CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zell-Subpopulationen ist mit einem signifikant besseren Therapieansprechen auf Ipilimumab assoziiert. Ein niedriger Anteil an CD56^{bright} NK-Zellen in den PBMCs im Blut vor Therapie mit Ipilimumab ist hochsignifikanter mit einem längeren Überleben assoziiert.

3.7. Stabile Erkrankung oder vollständiges Ansprechen? Evaluation der radiologischen Interpretation des Therapieansprechens auf Immuncheckpoint-Blockade im metastasierten malignen Melanom (Publikation F)

Die Bewertung des Ansprechens auf ICB-Therapie ist für die Beurteilung des weiteren therapeutischen Vorgehens außerordentlich relevant. Die radiologische Bewertung des Ansprechens dieser Behandlung ist allerdings herausfordernd, da sich die Ansprechmuster von den klassischen Mustern nach Chemotherapie unterscheiden. Demzufolge wurden die “immune-related response criteria” entwickelt. Allerdings fokussieren sich diese hauptsächlich auf die Entwicklung der Größe der Tumorläsionen im Zeitverlauf, während die Stoffwechselaktivität nicht berücksichtigt wird. Wir untersuchten anhand unserer Patienten, wie relevant die Stoffwechselaktivität gerade bei Patienten mit radiologisch stabiler Erkrankung ist. Über einen Zeitraum von bis zu 41 Monaten beobachteten wir den radiologischen Befund im CT- und ^{18}F -FDG PET von 7 Patienten mit SD nach/unter ICB.

Es zeigte sich, dass die Metastasen von 5 der 7 Patienten, die mittels CT als SD bewertet wurden, keine metabolische Aktivität ^{18}F -FDG PET/CT nach/unter Therapie mit ICB aufwiesen (Abb. 3.7.1.).

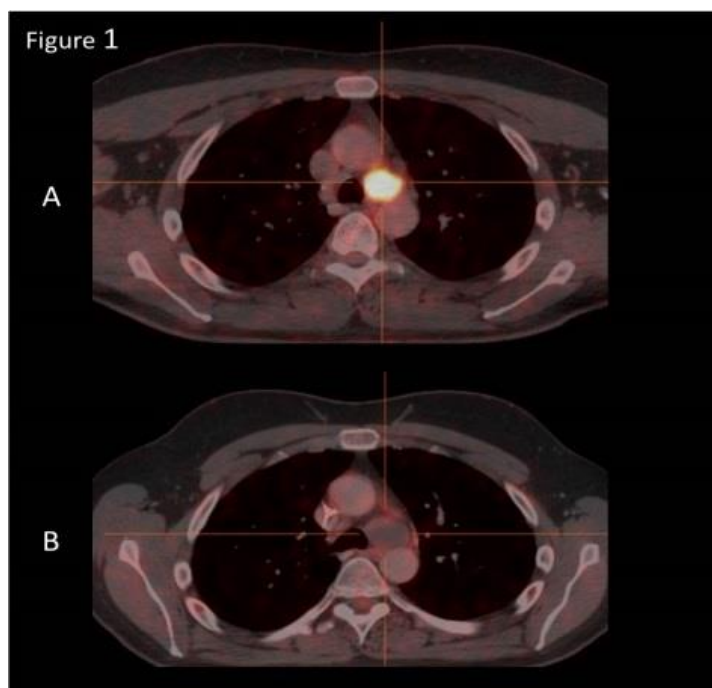


Abb. 3.7.1.: A) Stoffwechslaktivität einer Läsion im Mediastinum im ^{18}F -FDG PET/CT vor Therapie mit Ipilimumab
B) Unveränderte Größe der Metastase, aber keinerlei Stoffwechselaktivität nach Therapie (Tietze *et al.*, 2017b).

Wir entschieden uns bei fehlender Stoffwechselaktivität der Metastasen, die anti-PD1-Antikörper-Therapie von Patienten mit SD zu beenden. Bei Patienten mit SD nach Ipilimumabtherapie wurde keine weitere Therapie angeschlossen. In allen Fällen änderte sich trotz Therapiepause über den beobachteten Zeitraum von 13-41 Monaten die Größe der Metastasen nicht (Abb. 3.7.2.).

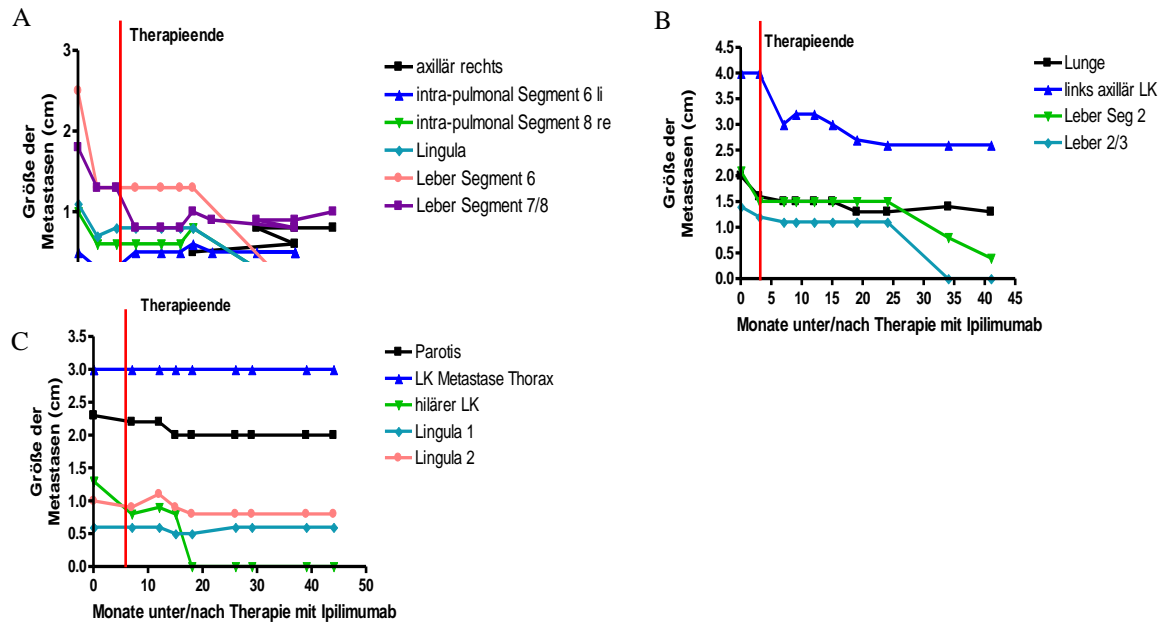


Abb. 3.7.2.: Darstellung der einzelnen Metastasen von drei mit Ipilimumab behandelten und mittels CT als SD bewerteten Patienten (A, B, C). Die Läsionen zeigten im ^{18}F -FDG PET/CT keine Stoffwechselaktivität. Auch nach Beendigung der Therapie war keine Progression im weiteren Verlauf ersichtlich (Tietze *et al.*, 2017b).

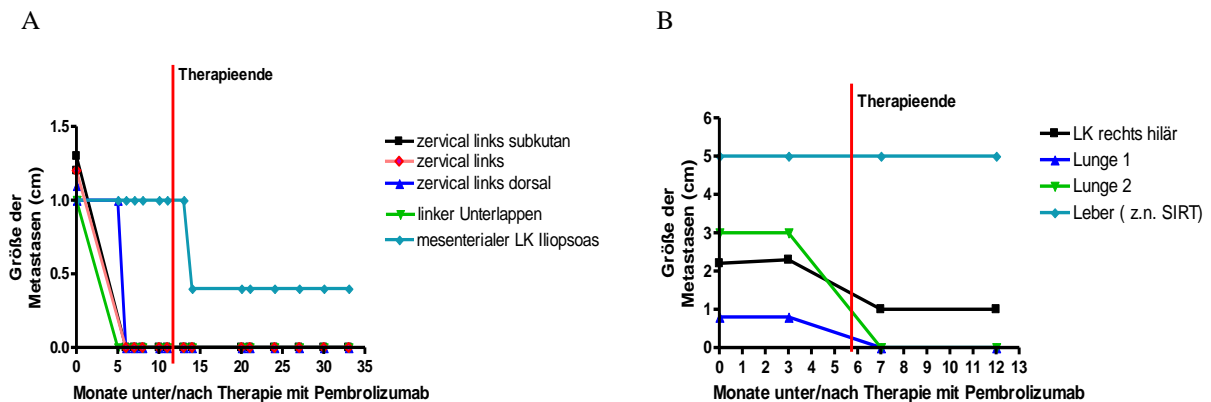


Abb. 3.7.3.: Die Metastasen von zwei mit Pembrolizumab therapierten Patientinnen (A, B) zeigten keinerlei Stoffwechselaktivität in der ^{18}F -FDG PET/CT und nahmen trotz Abbruch der Therapie im weiteren Verlauf nicht an Größe zu (Tietze *et al.*, 2017b).

Einer der Patienten mit SD nach Therapie mit Ipilimumab zeigte in der ^{18}F -FDG-PET/CT in einem Lymphknoten deutliche Stoffwechselaktivität. Die Lymphknotenmetastase wuchs im Verlauf (Abb. 3.7.4.a).

Eine weitere Patientin mit SD im CT zeigte Stoffwechselaktivität im ^{18}F -FDG-PET/CT an mehreren Lokalisationen unter Therapie mit Pembrolizumab. Wir führten die Therapie mit Pembrolizumab fort

und zunächst blieb die Größe der Metastasen stabil; aber im Verlauf nahmen sie plötzlich rasch an Größe zu und die Patientin verstarb (Abb. 3.7.4.b).

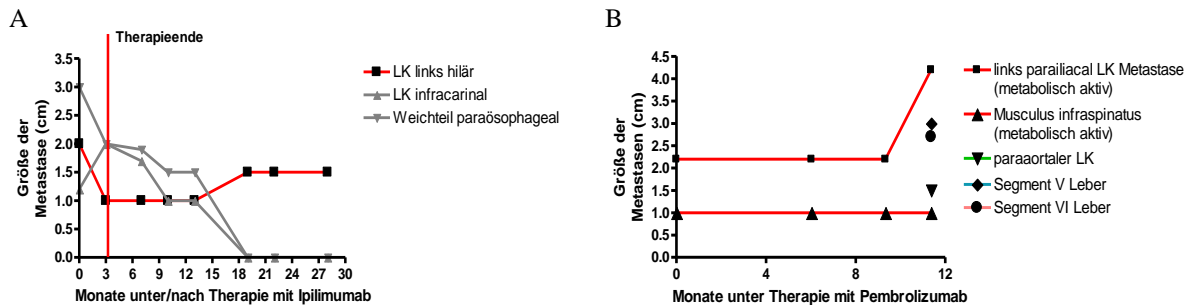


Abb. 3.7.4.: A) Ein Patient mit SD zeigt nach Therapie mit Ipilimumab in der ^{18}F -FDG PET/CT noch eine stoffwechselaktive Metastase, die im weiteren Verlauf ohne Therapie an Größe zunahm.

B) Die Metastasen einer Patientin mit SD unter Pembrolizumab zeigten in der ^{18}F -FDG PET/CT Stoffwechselaktivität; im weiteren Verlauf trotz Fortsetzen der Therapie nahmen sie rapide an Größe zu und führten zum Tod der Patientin (Tietze *et al.*, 2017b).

Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen halten wir es für sinnvoll, die Stoffwechselaktivität der Metastasen in die „Immune-RECIST Kriterien“ zur Bewertung des Ansprechens nach ICB insbesondere bei der Beurteilung der Patienten mit SD mit aufzunehmen. Bei fehlendem Nachweis von metabolischer Aktivität handelt es sich vermutlich um nicht mehr vitales Tumorgewebe, sondern eher um eine Art „Tumornarbe“, die zunächst nicht therapiebedürftig ist, allerdings regelmäßig beobachtet werden sollte. Wenn sich jedoch in den von der Größe her stabilen Metastasen noch nach mehreren Monaten Stoffwechselaktivität zeigt, so ist erhöhte Wachsamkeit geboten und es sollte eine Umstellung bzw. erneute Einleitung der Therapie erwogen werden.

Schlussfolgerung: Bei mit ICB therapierten Patienten mit SD sollte der Metabolismus der Metastasen in die Bewertung des Ansprechens mit einbezogen werden. Bei vollständig fehlendem Metabolismus kann eine Unterbrechung oder Beendigung der Therapie erwogen werden.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die ICB ist ein sehr innovativer Therapieansatz, mit hoher Relevanz in der modernen Melanomtherapie. Die Indikationen für ICB sind seit Einführung der Therapie im Jahre 2011 stetig angestiegen und nehmen weiter zu. So wurden auf ICB basierende Immuntherapien in den letzten Jahren für eine Reihe anderer Tumorentitäten zugelassen. Weiterhin laufen Studien, um sie auch im adjuvanten Bereich einzusetzen. Ihr genauer Wirkmechanismus ist allerdings immer noch nicht im Detail verstanden.

Nachteil der ICB ist das hohe Risiko von Nebenwirkungen, die in ihrer Komplexität die bislang von Tumorthérapien bekannten Nebenwirkungen weit in den Schatten stellen, sowie das Therapieversagen bei einem signifikanten Anteil der Patienten. Weitere Nachteile sind die nicht immer eindeutig vorgegebene Therapiedauer und die damit einhergehenden schwierigen Therapieentscheidungen sowie die hohen Kosten der Therapie.

Mit unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass eine bislang nicht beschriebene T-Zelle, nämlich eine Antigen-unspezifisch stimulierte CD8⁺ Gedächtnis-T-Zelle, die sogenannte Bystander-Zelle, eine relevante Rolle in der Immunabwehr nach Immuntherapie spielt. Die Zielzelle wird hierbei nicht über den TZR sondern über den NKG2D Rezeptor erkannt. Diese Antigen-unspezifischen stimulierten CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen können unabhängig von der Hilfe der CD4⁺ T-Zellen proliferieren. Die Proliferation dieser Zellen konnte auch bei Infektion mit Influenza nachgewiesen werden. Auch hier sind sie von immunologischer Relevanz, da sie dazu beitragen, die Viruslast in der Frühphase der Immunantwort, wenn die Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen noch nicht in ausreichender Zahl vorliegen, zu reduzieren. Bei der ICB-Therapie des Menschen scheinen diese Zellen ebenfalls wichtig zu sein, da Patienten mit einem zu geringen Anteil an CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen in unserer Kohorte in keinem Fall auf die Therapie mit Ipilimumab angesprochen haben. Der Anteil dieser Zellen an den CD8⁺ T-Zellen vor Therapie scheint als prädiktiver Marker für das Therapieansprechen geeignet zu sein und könnte möglicherweise zur Identifikation potenzieller Therapieversager auf Ipilimumab vor Therapiebeginn genutzt werden.

Weiterhin scheint das Melanom auch direkt auf das Immunsystem Einfluss zu nehmen. So ist ein höherer relativer und absoluter Anteil von NK-Zellen in den PBMCs für das Überleben des Patienten von Vorteil. Normwertige Anteile der CD56^{bright} NK-Zellen in den PBMCs vor Therapie mit Ipilimumab sind im Vergleich zu hohen Anteilen hochsignifikant mit einem besseren Überleben assoziiert. Dies scheint paradox, da es sich bei NK-Zellen um Anti-Tumor-Zellen handelt. Wir konnten aber zeigen, dass der Anteil an NK-Zellen mit höherem Organbefall von Metastasen, also höherer Tumorlast, zunimmt, der Aktivierungsgrad der NK-Zellen gemessen an der NKG2D-Expression hingegen mit höherer Tumorlast abnimmt. Ob das Melanom direkt auf die NK-Zellen einwirkt oder ein Erschöpfungsphänomen vorliegt, gilt es in weiteren Studien zu klären.

Weiterhin konnten wir beobachten, dass für die korrekte Einschätzung des Ansprechens auf die Immuntherapie das Durchführen eines 18F-FDG-PET/CT insbesondere bei Patienten mit im CT SD von großer Bedeutung ist. So sollte bei fehlender Tumoraktivität der Abbruch der ICB unter sorgfältiger Nachverfolgung des Tumors erfolgen bzw. keine neue weitere anschließende Therapie eingeleitet werden.

Für zukünftige Arbeiten ergeben sich aus den gewonnenen Erkenntnissen folgende Ziele:

- Prospektive Multicenter-Studien zur Etablierung der Messung von CD45RO+CD8+ T-Zellen als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf Ipilimumab. In den in dieser Habilitationsschrift gewonnenen Daten könnte bei der richtigen Selektion von Patienten Ipilimumab genauso wirksam sein wie die Kombinationstherapie von Ipilimumab und Nivolumab. Damit ließen sich bei Patienten Nebenwirkungen reduzieren sowie auch aufgrund der kurzen Therapiedauer Lebensqualität steigern und Kosten reduzieren.
- Studie zur Analyse des Einflusses von Melanomzellen auf das periphere Immunsystem zur Korrelation von Immunzellpopulationen mit den im Blut befindlichen Melanozyten.
- Analyse von Zytokin-Spiegeln im Verlauf der ICB-Therapie zur Entwicklung von prädiktiven Parametern zur Frühdiagnostik von Nebenwirkungen.

5. Verzeichnis der Abkürzungen

APZ	Antigen präsentierende Zelle
BrdU	Bromdesoxyuridin
C57/BL6	C57 Black 6
CD	Cluster of Differentiation
CR	Complete response (vollständiges Ansprechen)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DR4/5	Death receptor 4/5
DTIC	Dacarbazin
EBV	Epstein-Barr-Virus
18F-FDG-PET/CT	18F-Fluorodeoxyglukose-Positronenemissionstomographie/ Computertomographie-Untersuchung
ICB	Immun-Checkpoint-Blockade
IDO	Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
IL-2	Interleukin-2
KG	Körpergewicht
KO	Knock out
LK	Lymphknoten
MART-1	Melanoma antigen recognized by T cells 1
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MHC-1	Major Histocompatibility Complex
NK	Natürliche Killerzelle
NKG2D	natural-killer group 2, member D receptors
NKG2DL	natural-killer group 2, member D- receptors Ligand
OVA	Ovalbumin
PBMCs	peripheral blood monocytic cells
PD	Progressive disease (Progress)
PD-1	Programmed cell death protein 1

PD-1L	Programmed cell death protein 1 ligand
SD	Stable disease (stabile Erkrankung)
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIM3	T-cell-immunoglobulin and mucin-domain containing molecule 3
Treg	Regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
WT	Wildtyp

6. Literaturverzeichnis

Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, *et al.* (1999) High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17:2105-16.

Balkhi MY, Ma Q, Ahmad S, Junghans RP (2015) T cell exhaustion and Interleukin 2 downregulation. *Cytokine* 71:339-47.

Belz GT, Stevenson PG, Doherty PC (2000) Contemporary analysis of MHC-related immunodominance hierarchies in the CD8+ T cell response to influenza A viruses. *J Immunol* 165:2404-9.

Besser MJ (2013) Is there a future for adoptive cell transfer in melanoma patients? *Oncoimmunology* 2:e26098.

Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, De Plaen E, Lethe B, *et al.* (1993) The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of experimental medicine* 178:489-95.

Champsaur M, Lanier LL (2010) Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev* 235:267-85.

Comin-Anduix B, Sazegar H, Chodon T, Matsunaga D, Jalil J, von Euw E, *et al.* (2010) Modulation of cell signaling networks after CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *PloS one* 5:e12711.

Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, *et al.* (1994) Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264:716-9.

Deckhut AM, Allan W, McMickle A, Eichelberger M, Blackman MA, Doherty PC, *et al.* (1993) Prominent usage of V beta 8.3 T cells in the H-2Db-restricted response to an influenza A virus nucleoprotein epitope. *J Immunol* 151:2658-66.

Desbois M, Rusakiewicz S, Locher C, Zitvogel L, Chaput N (2012) Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies. *Frontiers in immunology* 3:395.

Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, *et al.* (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* 8:793-800.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137-48.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, *et al.* (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363:711-23.

Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, *et al.* (1994) Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:3515-9.

Kennedy R, Celis E (2006) T helper lymphocytes rescue CTL from activation-induced cell death. *Journal of immunology* 177:2862-72.

Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J (1998) Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 106:665-79.

Kumamoto Y, Mattei LM, Sellers S, Payne GW, Iwasaki A (2011) CD4+ T cells support cytotoxic T lymphocyte priming by controlling lymph node input. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:8749-54.

La Gruta NL, Kedzierska K, Pang K, Webby R, Davenport M, Chen W, *et al.* (2006) A virus-specific CD8+ T cell immunodominance hierarchy determined by antigen dose and precursor frequencies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:994-9.

Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, Atkinson V, Liszkay G, Maio M, *et al.* (2014) Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *The New England journal of medicine* 371:1867-76.

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, *et al.* (2015) Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine* 373:23-34.

Merelli B, Massi D, Cattaneo L, Mandala M (2014) Targeting the PD1/PD-L1 axis in melanoma: biological rationale, clinical challenges and opportunities. *Critical reviews in oncology/hematology* 89:140-65.

Moffat JM, Handel A, Doherty PC, Turner SJ, Thomas PG, La Gruta NL (2010) Influenza epitope-specific CD8+ T cell avidity, but not cytokine polyfunctionality, can be determined by TCRbeta clonotype. *J Immunol* 185:6850-6.

Monjazeb AM, Tietze JK, Grossenbacher SK, Hsiao HH, Zamora AE, Mirsoian A, *et al.* (2014) Bystander activation and anti-tumor effects of CD8+ T cells following Interleukin-2 based immunotherapy is independent of CD4+ T cell help. *PloS one* 9:e102709.

Murphy WJ, Welniak L, Back T, Hixon J, Subleski J, Seki N, *et al.* (2003) Synergistic anti-tumor responses after administration of agonistic antibodies to CD40 and IL-2: coordination of dendritic and CD8+ cell responses. *Journal of immunology* 170:2727-33.

Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, *et al.* (2015) Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *The New England journal of medicine* 372:2006-17.

Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, *et al.* (2015a) Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *The New England journal of medicine* 372:30-9.

Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, *et al.* (2015b) Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England journal of medicine* 372:320-30.

Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, *et al.* (2015c) Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England journal of medicine* 372:2521-32.

Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M DJ, Garbe C, *et al.* (2011) Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 364:2517-26.

Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, *et al.* (2015) Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33:1889-94.

Sckisel GD, Tietze JK, Zamora AE, Hsiao HH, Priest SO, Wilkins DE, *et al.* (2014) Influenza infection results in local expansion of memory CD8(+) T cells with antigen non-specific phenotype and function. *Clinical and experimental immunology* 175:79-91.

Tietze JK, Angelova D, Heppt MV, Reinholz M, Murphy WJ, Spannagl M, *et al.* (2017a) The proportion of circulating CD45RO+CD8+ memory T cells is correlated with clinical response in melanoma patients treated with ipilimumab. *European journal of cancer* 75:268-79.

Tietze JK, Angelova D, Heppt MV, Ruzicka T, Berking C (2016) Low baseline levels of NK cells may predict a positive response to ipilimumab in melanoma therapy. *Experimental dermatology*.

Tietze JK, Berking C (2014) [New treatment options for metastatic melanoma]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 139:1462-7.

Tietze JK, Heppt M, Angelova D, Ruzicka T, Berger F, Berking C (2017b) [Stable disease or complete response? : A critical evaluation of the radiologic response to immune checkpoint blockade in

advanced melanoma]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 68:632-8.

Tietze JK, Sckisel GD, Hsiao HH, Murphy WJ (2011) Antigen-specific versus antigen-nonspecific immunotherapeutic approaches for human melanoma: the need for integration for optimal efficacy? *International reviews of immunology* 30:238-93.

Tietze JK, Wilkins DE, Sckisel GD, Bouchlaka MN, Alderson KL, Weiss JM, *et al.* (2012) Delineation of antigen-specific and antigen-nonspecific CD8(+) memory T-cell responses after cytokine-based cancer immunotherapy. *Blood* 119:3073-83.

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, *et al.* (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643-7.

Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, *et al.* (2015) Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 16:375-84.

Zhang S, Zhang H, Zhao J (2009) The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochemical and biophysical research communications* 384:405-8.

7. Anhang

7.1. Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. mult. Ruzicka danke ich sehr herzlich, dass er sich als mein Mentor zur Verfügung gestellt und mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Habilitation an seiner Klinik durchzuführen. Außerdem bin ich ihm für alle seine hilfreichen Anregungen sehr verbunden.

Besonders danken möchte ich Frau Professor Dr. Carola Berking für die Übernahme der Funktion meiner Mentorin für die Habilitation, für die Einführung auf das nationale Parkett der Onkologie sowie für ihren immer sehr wertvollen Rat und ihre Unterstützung.

Professor Simon Rothenfusser möchte ich für die Übernahme der Mentorenfunktion sowie für seine freundliche und hilfsbereite Art danken.

Meinem Kollegen und Freund Dr. Markus Heppt danke ich sehr für seinen Beistand inhaltlicher und moralischer Art, seinen Input und für die sich hervorragend ergänzende Zusammenarbeit.

Meinem lieben Mann Julio Gallardo Cornago danke ich von ganzen Herzen für die liebevolle Unterstützung und seine unendliche Geduld mit mir.

Meiner Mutter Frau Karin Tietze danke ich von ganzem Herzen für ihren liebevollen Rückhalt.

Mein besonderer Dank gebührt meinem Vater Herrn Professor Dr. Dr. h.c. mult. Lutz Friedjan Tietze. Ich danke ihm für seine hilfreichen Kommentare zu allen an ihn herangetragenen Fragen, seine uneingeschränkte Hilfestellung bei allen Problemen und sein unerschütterliches Vertrauen in mich.

7.2. Vollständige Liste aller Publikationen von Julia K. Tietze

Originalartikel als Erstautorin

1. **Tietze JK**, Heppt MV, Angelova D, Ruzicka T, Berger F, Berking C
Stable disease or complete response? A critical evaluation of the radiologic response to immune checkpoint blockade in advanced melanoma
Hautarzt 2017, 68:632-638, Impact Factor 0,5
2. **Tietze JK**, Angelova D, Heppt MV, Reinholz M, Murphy WJ, Spannagl M, Ruzicka T, Berking C
The proportion of circulating CD45RO+CD8+ memory T cells is correlated with clinical response in melanoma patients treated with ipilimumab
Eur J Cancer 2017, 75:268-279, Impact Factor 6,1
3. **Tietze JK**, Angelova D, Heppt MV, Ruzicka T, Berking C (2017)
Low amounts of NK cells may predict a positive response to ipilimumab in melanoma therapy
Exp Dermatol. 2017, 26:622-629, Impact Factor 2,7
4. Heppt MV*, **Tietze JK***, Reinholz M, Rahimi F, Jung A, Kirchner T, Ruzicka T, Flaig MJ, Berking C. (*These authors contributed equally to the work)
Disease kinetics but not disease burden is relevant for survival in melanoma of unknown primary tumor
Discov Med. 2015, 20:231-237, Impact Factor 3,4
5. **Tietze JK**, Heppt MV, v. Preußen A, Wolf U, Ruzicka T, Wolff H, Sattler E (2015)
Oral isotretinoin as a treatment option in folliculitis decalvans: a retrospective comparison of different treatment regimen in 28 patients
J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015, 29:1816-1821, Impact Factor 3,0
6. Monjazeb AM*, **Tietze JK***, Grossenbacher SK, Hsiao HH, Zamora AE, Mirsoian A, Koehn B, Blazar BR, Weiss JM, Wiltout RH, Sckisel GD, Murphy WJ
(*These authors contributed equally to the work)
Bystander activation and anti-tumor effects of CD8+ T cells following interleukin-2 based immunotherapy is independent of CD4+ T cell help
PLoS One. 2014, 9:e102709, Impact Factor 3,2
7. Sckisel GD*, **Tietze JK***, Zamora AE, Hsiao HH, Priest SO, Wilkins DE, Lanier LL, Blazar BR, Baumgarth N, Murphy WJ (2014)
(*These authors contributed equally to the work)
Influenza infection results in local expansion of memory CD8 (+) T cells with antigen non-specific phenotype and function
Clin Exp Immunol. 2014, 175:79-91, Impact Factor 3,1
8. **Tietze JK**, Pfob M, Eggert M, von Preußen A, Mehraein Y, Ruzicka T, Herzinger T
A non-coding mutation in the 5' untranslated region of patched homologue 1 predisposes to basal cell carcinoma
Exp Dermatol. 2013, 22:834-835, Impact Factor 4,1
9. **Tietze JK**, Wilkins DE, Sckisel GD, Bouchlaka MN, Alderson KL, Weiss JM, Ames E, Bruhn KW, Craft N, Wiltout RH, Longo DL, Lanier LL, Blazar BR, Redelman D, Murphy WJ
Delineation of antigen-specific and antigen-nonspecific CD8(+) memory T-cell responses after cytokine-based cancer immunotherapy
Blood 2012, 119:3073-3083, Impact Factor 9,1

Originalarbeiten als Koautorin

1. Heppt MV, Heinzerling L, Kähler KC, Forschner A, Kirchberger MC, Loquai C, Meissner M, Meier F, Terheyden P, Schell B, Herbst R, Göppner D, Kiecker F, Rafei-Shamsabadi D, Haferkamp S, Huber MA, Utikal J, Ziemer M, Bumeder I, Pfeiffer C, Schäd SG, Schmid-Tannwald C, **Tietze JK**, Eigentler TK, Berking C
Prognostic factors and outcomes in metastatic uveal melanoma treated with programmed cell death-1 or combined PD-1/cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 inhibition
Eur J Cancer 2017, 82:56-65, Impact Factor 6,1
2. Heppt MV, Roesch A, Weide B, Gutzmer R, Meier F, Loquai C, Kähler KC, Gesierich A, Meissner M, von Bubnoff D, Göppner D, Schlaak M, Pföhler C, Utikal J, Heinzerling L, Cosgarea I, Engel J, Eckel R, Martens A, Mirlach L, Satzger I, Schubert-Fritschle G, **Tietze JK**, Berking C
Prognostic factors and treatment outcomes in 444 patients with mucosal melanoma.
Eur J Cancer 2017, 81:36-44, Impact Factor 6,1
3. von Braunmühl T, Hartmann D, **Tietze JK**, Cekovic D, Kunte C, Ruzicka T, Berking C, Sattler EC
Morphologic features of basal cell carcinoma using the en-face mode in frequency domain optical coherence tomography
J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016, 30:1919-1925, Impact Factor 3,0
4. Heppt MV, Eigentler TK, Kähler KC, Herbst RA, Göppner D, Gambichler T, Ulrich J, Dippel E, Loquai C, Schell B, Schilling B, Schäd SG, Schultz ES, Matheis F, **Tietze JK**, Berking C
Immune checkpoint blockade with concurrent electrochemotherapy in advanced melanoma: a retrospective multicenter analysis
Cancer Immunol Immunother. 2016, 65:951-959, Impact Factor 4,8
5. Zimmer L, Goldinger SM, Hofmann L, MD, Loquai C, Ugurel S, Thomas I, Schmidgen MI, Gutzmer R; Utikal JS, Göppner D, Hassel JC, Meier F, **Tietze JK**, Forschner A, Weishaupt C, Leverkus M, Wahl RU, MD; Dietrich U, Garbe C, Kirchberger MC, Eigentler T, Berking C, Gesierich A, Krackhardt AM, Schadendorf D, Schuler G, Dummer R, Heinzerling L
Neurological, respiratory, musculoskeletal, cardiac and ocular side effects of anti-PD-1 therapy
Eur J Cancer. 2016, 60:190-209, Impact Factor 6,1
6. Zimmer L, Goldinger SM, Hofmann L, MD, Loquai C, Ugurel S, Thomas I, Schmidgen MI, Gutzmer R; Utikal JS, Göppner D, Hassel JC, Meier F, **Tietze JK**, Forschner A, Weishaupt C, Leverkus M, Wahl RU, MD; Dietrich U, Garbe C, Kirchberger MC, Eigentler T, Berking C, Gesierich A, Krackhardt AM, Schadendorf D, Schuler G, Dummer R, Heinzerling L
Cutaneous, gastrointestinal, hepatic, endocrine and renal side effects of anti-PD-1 therapy
Eur J Cancer. 2016, 60:210-225, Impact Factor 6,1
7. Reinholz M, Schwaiger H, Heppt MV, Poetschke J, **Tietze J**, Eppler A, Ruzicka T, Kaudewitz P, Gauglitz GG.
Comparison of Two Kinds of Lasers in the Treatment of Acne Scars
Facial Plast Surg. 2015, 30:87-88, Impact Factor 0,6
8. Sckisel GD, Mirsoian A, Bouchlaka MN, **Tietze JK**, Chen M, Blazar BR, Murphy WJ
Late administration of murine CTLA-4 blockade prolongs CD8-mediated anti-tumor effects following stimulatory cancer immunotherapy
Cancer Immunol Immunother. 2015 64:1541-52, Impact Factor 4,8
9. Heppt MV, Reinholz M, **Tietze JK**, French LE, Berking C, Kamarashev J
Clinicopathologic features of primary cutaneous melanoma: a single center analysis from a Swiss regional population
Eur J Dermatol. 2015, 20:231-237, Impact Factor 2,1

10. Schneller J, Reiser M, Beuschlein F, Osswald A, Pallauf A, Riester A, **Tietze JK**, Reincke M, Degenhart C
Linear and volumetric evaluation of the adrenal gland-MDCT-based measurements of the adrenals
Acad Radiol. 2014, 21:1465-74, Impact Factor 2,0
11. Li G, **Tietze JK**, Tao X, Kulichova D, Ruzicka T, Berking C, Maier T
High-Definition Optical Coherence Tomography in the Diagnosis of Basal Cell Carcinoma Evaluated by an Experienced Versus Inexperienced Investigator
J Clin Exp Dermatol Res. 2014, 5:227-231, Impact Factor 0,5
12. Katzer K, **Tietze J**, Klein E, Heinemann V, Ruzicka T, Wollenberg A (2010)
Topical therapy with Nadifloxacin Cream and Prednicarbate Cream improves acneiform eruptions caused by the EGFR-Inhibitor Cetuximab – a report of 29 patients
Eur J Dermatol. 2010, 20:82-84, Impact Factor 1,1
13. Beyersdorf N*, Ding X*, **Tietze JK***, Hanke T
Characterization of mouse CD4 T cell subsets defined by expression of KLRG1
(*These authors contributed equally to the work)
Eur J Immunol. 2007, 37:3445-3454, Impact Factor 2,3

Fallmitteilungen

1. Heppt MV, Goldscheider I, **Tietze JK**, Berking C
Intralesional interleukin-2 for unresectable mucosal melanoma refractory to nivolumab
Cancer Immunol Immunother. 2017, [Epub ahead of print], Impact Factor 4,8
2. Gerdes LA, Held K, Beltrán E, Berking C, Prinz JC, Junker A, **Tietze JK**, Ertl-Wagner B, Straube A, Kümpfel T, Dornmair K, Hohlfeld R
CTLA4 as Immunological Checkpoint in the Development of Multiple Sclerosis
Ann Neurol. 2016, 80:294-300, Impact Factor 9,6
3. Reinholz M, Heppt M, **Tietze JK**, Ruzicka T, Gauglitz GG, Schaubert J
Photoletter to the editor: Topical 0.5% brimonidine gel to camouflage redness of immature scars
J Dermatol Case Rep. 2015, 30:87-88, Impact Factor 0,8
4. **Tietze JK**, Heppt MV, Flaig, MJ, Thomas P
Successful treatment of lichen amyloidosis with oral alitretinoin
J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016, 30:884-885, Impact Factor 3,0

Übersichtsarbeiten in Zeitschriften

1. Hassel JC, Heinzerling L, Aberle J, Bähr O, Eigentler TK, Grimm MO, Grünwald V, Leipe J, Reinmuth N, **Tietze JK**, Trojan J, Zimmer L, Gutzmer R.
Combined immune checkpoint blockade (anti-PD-1/anti-CTLA-4): Evaluation and management of adverse drug reactions.
Cancer Treat Rev. 2017, 57:36-49, Impact Factor 8,6
2. Heppt MV, Dietrich C, Graf SA, Ruzicka T, **Tietze JK**, Berking C
The Systemic Management of Advanced Melanoma in 2016
Oncol Res Treat. 2016, 39:635-642, Impact Factor 1,3
3. **Tietze JK**, Heppt MV, Graf SA, Berking C
Das metastasierte maligne Melanom, aktuelle und neue Standards in der Therapie
CME; 2015 18, 40–46, Impact Factor 0,1

4. **Tietze JK**

Antikörpertherapie in der onkologischen Dermatologie
Pharma Fokus Onkologie, 2015, kein Impact

5. Heppt MV, **Tietze JK**, Graf SA, Berking C

Combination therapy using kinase inhibitors in Malignant Melanoma
Current Opinion in Oncology, 2015, 27:134-40, Impact Factor 4,3

6. **Tietze JK**, Berking C

New treatment options for metastatic melanoma
Dtsch. Med. Wochenschr. 2014, 139:1462-1467, Impact Factor 0,4

7. **Tietze JK**, Sckisel G, Hsiao H, Murphy WJ

Antigen specific versus antigen non-specific immunotherapeutic approaches for human melanoma: the need for integration for optimal efficacy?
Int. Rev. Immunol. 2011, 30:238-293, Impact Factor 2,3

8. Sárdy M, **Tietze J**

[Dermatitis herpetiformis. An update of the pathogenesis]
Hautarzt, 2009, 60:627-630, Impact Factor 0,4

Buchkapitel

Tietze JK

1. "Virusinfektionen der Haut" und "Erkrankung der Hautanhangsgebilde"

Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter
9. Auflage, Editor: Reinhard D, Springer Verlag, 2014

2. Sckisel GD, **Tietze JK**, Murphy WJ

Revisiting the paradigm on the putative need for antigen-specific responses in cancer vaccines: From research to clinical practice
Informa Healthcare, London-New York, 2011

Sonstige Veröffentlichungen (Leitlinien/Kongressbericht)

1. Reinholz M, **Tietze JK**, Kilian K, Schaller M, Schöfer H, Lehmann P, Zierhut M, Klövekorn W, Ruzicka T, Schaubert J (2013)

Rosazea
J Dtsch. Dermatol. Ges. 2013, 11:768-80, Impact Factor 1,8

2. Gauwerky K, Klövekorn W, Korting HC, Lehmann P, Meigel EM, Reinel D, Ruzicka T, Schaller M, Schöfer H, **Tietze J**

Rosazea
J. Dtsch. Dermatol. Ges. 2009, 7:996-1003, Impact Factor 1,4

3. **Tietze J**

Kongressbericht, Management der Neurodermitis in Klinik und Praxis
Allergojournal 2008, Impact Factor 0,1

7.3. Publikationen A-F

- A)** Blood. 2012 Mar 29;119(13):3073-83. doi: 10.1182/blood-2011-07-369736. PMID: 22251483
- B)** PLoS One. 2014 Aug 13;9(8):e102709. doi: 10.1371/journal.pone.0102709 PMID: 25119341
- C)** Clin Exp Immunol. 2014 Jan;175(1):79-91. doi: 10.1111/cei.12186. PMID: 23937663
- D)** Eur J Cancer. 2017 Apr;75:268-279. doi: 10.1016/j.ejca.2016.12.031. PMID: 28242504
- E)** Exp Dermatol. 2017 Jul;26(7):622-629. doi: 10.1111/exd.13263. PMID: 278926523
- F)** Hautarzt. 2017 Aug;68(8):632-638. doi: 10.1007/s00105-017-3972-x. PMID: 28382381